

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra experimentální biologie rostlin
Studijní program: Biologie
Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



Lilly Dejová

Rostlinné tomosyny a jejich funkce v sekreci

Plant tomosyns and their role in secretion

Školitel: RNDr. Michal Hála, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 01.01.2019

Podpis

Poděkování

Ráda bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Michalu Hálovi Ph.D. za obrovskou ochotu, trpělivost, pomoc a vedení mé práce. Také bych chtěla poděkovat všem z laboratoře 202 za přátelskou atmosféru, cenné rady a ochotu zodpovědět jakýkoli dotaz. Zvlášť bych ráda poděkovala Mgr. Klárce Batystové za pomoc při mikroskopování a Mgr. Jáchymu Metličkovi za pomoc při úpravě obrázků. Děkuji také své rodině za psychickou podporu.

Abstrakt

Tomosyn je protein patřící do rodiny Lgl, zároveň je konzervovaný napříč živočišnou i rostlinnou říší. Skládá se z N-terminální domény obsahující WD40 motiv a C-terminální domény, kde se na konci nachází R-SNARE motiv. Tento motiv je homologní s R-SNARE motivem synaptobrevinu, proteinu nacházejícího se na povrchu váčků a účastnícího se tvorby SNARE komplexu a následného fúzování váčků s plazmatickou membránou. Rolí tomosynu je tak zejména regulace exocytózy. Kromě živočišného tomosynu je prostudován jeho kvasinkový homolog Sro7/Sro77, který ale v průběhu evoluce svůj R-SNARE motiv ztratil. Rostlinné tomosyny tak zůstávají neprobádanou oblastí. Cílem této práce bylo charakterizovat oba rostlinné tomosyny AtTYN1 a AtTYN2 v *Arabidopsis thaliana*. Experimentální práce zahrnovala bioinformatickou analýzu, tvorbu DNA konstruktů, hledání interaktorů pomocí dvouhybridního kvasinkového systému a sledování lokalizace konfokálním mikroskopem. Výsledky bioinformatické analýzy, jehož součástí bylo vytvoření fylogenetického stromu, odhalily konzervaci tomosynu napříč různými třídami rostlin a rozdělení obou tomosynů do odlišných klastřů. V klastru s homologem AtTYN2 se nenacházel ani jeden zástupce výtrusných rostlin. Z obou tomosynů byl konfokálním mikroskopem sledován a lokalizován pouze AtTYN2, který se nacházel v cytoplasmě. Dvouhybridní kvasinkový systém neodhalil interaktory ani v jednom z rostlinných tomosynů.

Klíčová slova: tomosyn, SNARE, exocytóza, regulace, rostliny

Abstract

Tomosyn is a protein belonging to the Lgl family and conserved across the animal and plant kingdom. Tomosyn is composed of N-terminal domain containing WD40 motif and C-terminal domain, where the R-SNARE motif is located at the end of the C-terminal domain. This motif is classified as homologous to R-SNARE motif of synaptobrevine, which is a protein located on the surface of the vesicles and participating in the formation of SNARE complex and subsequent fusion of the vesicles with the plasma membrane. Thus the role of this tomosyn is mainly the regulation of exocytosis. Apart from the animal tomosyn, its yeast homolog Sro7/Sro77 is also examined, however during the evolution it has lost its R-SNARE motif and therefore the plant tomosyns remain unexplored. The aim of this diploma thesis was to characterize both of the plant tomosyns: AtTYN1 and AtTYN2 in *Arabidopsis thaliana* plant. The experimental thesis included the bioinformatic analysis, the DNA construct creation, a search for interactors by yeast two-hybrid system and monitoring the localization using the confocal microscope. The bioinformatic analysis results, including the creation of phylogenetic tree, not only revealed the conservation of tomosyns across the different classes, but also the division of both tomosyns into different clusters. There was not a single representative of spruce plants in the AtTYN2 homologue cluster. From both of tomosyns, only the AtTYN2 homolog was monitored by confocal microscopy. AtTYN2 was found localized in cytoplasm. The yeast two-hybrid system did not detect any interactors neither in one of the plant tomosyns.

Keywords: tomosyn, SNARE, exocytosis, regulation, plants

OBSAH

1.	LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
1.1.	TRANSPORT V BUŇCE	9
1.2.	SNARE	10
1.3.	TOMOSYNY	13
1.3.1.	Struktura tomosynu	14
1.3.2.	Role tomosynu v exocytóze	16
1.3.3.	Studium tomosynu u <i>Caenorhabditis elegans</i>	19
1.3.4.	Regulace tomosynu	20
1.4.	LGL RODINA	21
1.4.1.	Struktura Lgl proteinů	22
1.4.2.	Jak reguluje Sro7/77 exocytózu	23
1.5.	TOMOSYNY U ROSTLIN	25
2.	MATERIÁL A METODY	27
2.1.	MÉDIA	27
2.2.	TRANSFORMACE	29
2.2.1.	Stabilní transformace <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
2.2.2.	Transientní transformace listu <i>Nicotiana benthamiana</i>	29
2.3.	PRÁCE S DNA	30
2.3.1.	Izolace plazmidové DNA	30
2.3.2.	Izolace genomické DNA	30
2.3.3.	Pomocí DNazolu	30
2.3.4.	Polymerázová řetězová reakce	31
2.3.5.	Restrikce DNA	32
2.3.6.	Ligace DNA	33
2.3.7.	Gateway	33
2.3.8.	Agarózová elektroforéza	34
2.3.9.	Sekvenování	34
2.4.	PĚSTOVÁNÍ ROSTLIN A BAKTERIÍ	35
2.4.1.	Pěstování rostlinného materiálu	35
2.4.2.	Suchá sterilizace semen	35
2.4.3.	Příprava kompetentních buněk	35
2.4.4.	Elektroporace bakterií	36
2.5.	PRÁCE S KVASINKAMI	36
2.5.1.	Transformace kvasinek	36
2.5.2.	Dvouhybridní kvasinkový systém	37
2.5.3.	Testování interakcí proti cDNA knihovně	37
2.6.	MIKROSKOPOVÁNÍ	38
3.	VÝSLEDKY	40
3.1.	FYLOGENETIKA	40
3.2.	ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA AtTYN1, AtTYN2 A JEJICH EXPRESE	41
3.3.	EXPRESE A KLONOVÁNÍ	46
3.3.1.	Klonování AtTYN1	46
3.3.2.	Klonování AtTYN2	48
3.4.	DVOUHYBRIDNÍ KVASINKOVÝ SYSTÉM	50
3.5.	LOKALIZACE	53
4.	DISKUZE	57
4.1.	ANOTACE ROSTLINNÝCH TOMOSYNŮ	57
4.2.	LGL A TOMOSYNY, ROZDĚLENÍ U ŽIVOČICHŮ, KVASINEK A ROSTLIN	58
4.3.	INTERAKTORY TOMOSYNŮ U KVASINEK, ŽIVOČICHŮ A ROSTLIN	60
4.4.	LOKALIZACE TOMOSYNU U ŽIVOČICHŮ, KVASINEK A ROSTLIN	61

5.	ZÁVĚR.....	63
6.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	65

Seznam zkratek

AK	aminokyselina
AVP	arginin vasopresin
CAPS	calcium-dependent activator protein for secretion
Cdk5	cyklin-dependentní kináza 5
DCV	velké granulární váčky
ddH ₂ O	dvakrát destilovaná voda
DG	dyrus gentatus
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ER	endoplazmatické retikulum
GDP	guanosin difosfát
GFP	zelený fluorescenční protein
GTP	guanosin trifosfát
KCl	chlorid draselný
LPA	kyselina lysofosfatidová
MF	mechová vlákna
MPA	masopeptonový agar
MPB	masopeptonový bujón
MS	Murashige-Skoog
NEM	N-ethylmaleimid
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive factor
PACAP	hypofyzární adenylát cyklázu aktivující protein (z ang. pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide)
PCR	polymerázová řetězová reakce
PM	plazmatická membrána
ResP	resting pool
ROCK	Rho-asociovaná kináza
RRP	readily releasable pool
SCG	superiorní cervikální ganglion
SNARE	N-ethylmaleimide-sensitive factor adaptor protein receptor
SNP	jednonukleový polymorfismus
SV	synaptické vezikuly
TGN	trans-Golgi network
TRP	total recycling pool

1. Literární přehled

1.1. Transport v buňce

Eukaryotická buňka je složitý systém obsahující velké množství organel oddělenými od cytosolu membránami, které zajišťují kompartmentaci buňky. Mezi jádrem a cytoplasmatickými kompartmenty zajišťují transport makromolekul jaderné póry. Malé molekuly do velikosti 40 kDa se transportují prostřednictvím usnadněné difúze, větší molekuly už procházejí přes jaderné póry prostřednictvím importinů a exportinů. Tyto proteiny rozeznávají lokalizační signály na přenášených makromolekulách a dokážou se navázat na proteiny jaderného póru. Také se vážou na malé Ran GTPázy, které řídí export a import v závislosti na vazbě GTP nebo GDP (Görlich, 1998).

Z cytosolu jsou do cílových destinací proteiny transportovány nejčastěji konvenční sekrecí. Po rozpoznání signální sekvence vznikajícího proteinu pomocí nukleoproteinového komplexu SRP (z angl. signal recognition particle) je celý komplex přemístěn na ER. SRP zde interaguje se svým receptorem a translace nascentního proteinu, prozatím pozastavená, pokračuje skrze translokon do lumen ER. V endoplazmatickém retikulu je signální sekvence proteinu odštěpena a proteiny jsou následně za pomoci chaperonů správně složeny a směrovány do váčků s COPII komplexem. COPII váčky jsou dopravovány do ER-Golgi intermediárního kompartmentu (v případě živočichů) nebo do cis-Golgi (u kvasinek a rostlin). Uniklé proteiny z lumen ER jsou transportovány zpět prostřednictvím retrográdního transportu zprostředkovaného COPI váčky, tj. váčky obalenými COPI obalovým komplexem.

Sekretované proteiny jsou pak dále transportovány pomocí dozrávání neboli maturace cisteren do TGN (Viotti, 2016). Existují i další dvě hypotézy pohybu molekul skrz Golgiho aparát. Konkrétně se jedná o váčkový transport, kdy se proteiny pohybují mezi cisternami odštěpováním váčků z jedné cisterny a následnou fúzí na druhou. Druhou hypotézou je, že se proteiny pohybují prostřednictvím přechodných tubulů, které vznikají mezi cisternami (Farquhar a Palade, 1998; Beznoussenko et al., 2014). V TGN jsou proteiny určené k sekreci tříděny v sekrečních váčcích nebo v nezralých sekrečních granulech. Sekreční váčky jsou konstitutivně dopravovány směrem k PM, zatímco sekreční granula jsou

akumulovány v cytoplasmě. Po specifickém stimulu jsou zralá sekreční granula transportována na plazmatickou membránu. Tyto poslední kroky sekrece jsou regulovány mj. také poutacím komplexem exocyst. Exocyst je komplex osmi podjednotek (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 a Exo84), původně objevený v kvasinkách, který ve spolupráci se malými GTPázami rodiny Rab, Ral a Rho poutá vezikuly na plazmatickou membránu (TerBush et al., 1996; Wu et al., 2008). Samotnou fúzi váčků s plazmatickou membránou zajišťují SNARE proteiny (z angl. SNAP Receptors -viz. kap. SNARE). Proteiny, které jsou určeny ke transportu do vakuoly, jsou dopravovány do pozdního endosomu a odtud dále do vakuoly (Viotti, 2016). Existuje také nekonvenční sekrece proteinů, která také začíná v ER. Vezikuly jsou transportovány na povrch plazmatické membrány, ale obchází Golgiho aparát. Stejně tak existuje možnost přímého transportu proteinů z ER do vakuoly, tento typ sekrece je u rostlin spojen s autofagií a dopravou sekundárních metabolitů, např. antokyanů (Nickel a Seedorf, 2008; Goring, 2017).

1.2. SNARE

Členové této rodiny proteinů se nacházejí napříč všemi eukaryoty, rostliny nevyjímaje. Všechny proteiny obsahují SNARE doménu, což je úsek 60-70 AK skládající se z heptadových repetit, které tvoří tzv. coiled coil struktury, tj. rozsáhlé domény sloužící k protein-proteinové interakci. SNARE fungují jako mediátory fúze mezi váčkovými i a cílovými membránami, tyto proteiny společně vytvářejí vysoce stabilní protein-proteinové interakce, známé pod názvem SNARE komplex. SNARE komplex pomáhá snížit energetickou bariéru potřebnou pro membránovou fúzi. Typický SNARE komplex zahrnuje tři různé typy SNARE proteinů, přičemž dva z nich se nacházejí zpravidla na cílové membráně (t-SNARE) a jeden protein je lokalizovaný na vezikulu (v-SNARE). Společně vytvářejí čtyřhelixovou strukturu vzájemně propojených domén. To je způsobeno faktem, že zpravidla jedna z podjednotek SNARE komplexu nese dvě takovéto domény. Tříhelixová struktura není v neuronálních SNARE komplexech běžná, což v rostlinách zpravidla neplatí (Lipka et al., 2007; Jahn a Scheller, 2006). Například v *Arabidopsis* se nachází 18 syntaxin-like genů (nesoucí jednu SNARE doménu) a pouze tři SNAP-25-like geny nesoucí dvě SNARE domény (Sutter et al., 2006). Podle přítomnosti konzervovaného zbytku glutaminu

nebo argininu uprostřed domény se SNARE proteiny dělí na Q- a R- SNARE. Obecně platí, že domény t-SNARE obsahují konzervovaný glutamin a domény v-SNARE zase arginin. Q-SNARE se podle motivů dělí na Qa-, Qb- a Qc-SNARE, SNAP-25 proteiny obsahují Qb- a Qc-SNARE motivy a Qa-SNARE jsou zpravidla označovány jako syntaxiny. R-SNARE jsou označovány jako VAMPs (z angl. vesicle associated membrane protein) a podle délky N-terminální domény se dělí ještě na breviny (lat. brevis, krátký) a longiny (lat. longis, dlouhý). V rostlinách všechny R-SNARE patří do kategorie brevinů.

Struktura syntaxinu se skládá z N-terminální autoregulační domény, linkeru, SNARE domény a transmembránové domény. N-terminální autoinhibiční doména obsahuje tři Habc domény, které po navázání na SNARE doménu vytvoří uzavřenou konformaci syntaxinu, čímž je zabráněno interakci syntaxinu s jinými SNARE proteiny (Lipka et al., 2007).

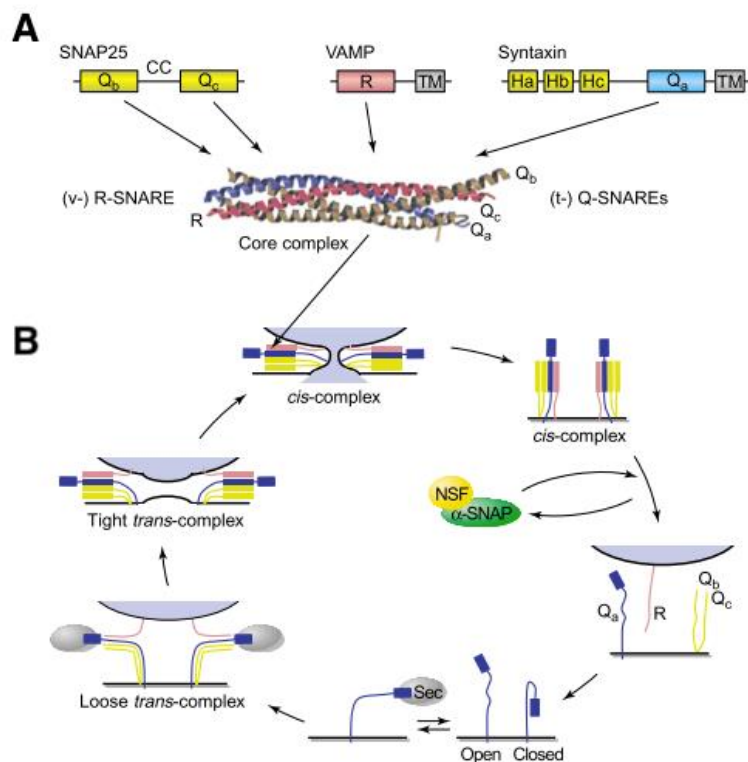
Mezi nejdůležitější regulátory SNARE proteinů patří SM proteiny. Existují čtyři podrodiny SM proteinů účastníci se exocytózy (Sec1/Munc18), endocytózy (Vps45), biosyntézy proteinů (Sly1) a degradace proteinů ve vakuole (Vps33). SM proteiny se převážně vážou na N-terminální doménu syntaxinu, nicméně to neplatí univerzálně. Příkladem jsou proteiny Sec1p a Vps33p, které se na N-konec syntaxinu nevážou (Koumandou et al., 2007). Sec1p se váže až na ternární SNARE komplex a ve spolupráci se Sec6p reguluje správné sestavení SNARE komplexu (Togneri, et al., 2006; Morgera et al., 2012). Podobně funguje také Vps33p, který je součástí vakuolárního poutacího komplexu HOPS, prostřednictvím kterého interaguje se SNARE komplexem (Lobingier a Merz, 2012). Poprvé byly SM proteiny popsány při interakci syntaxinu-1 s Munc-18, kdy se Munc-18 naváže na syntaxin-1 a společně vytvoří uzavřený komplex. Syntaxin-1 je tak inhibován, dokud se správně nelokalizuje na plazmatickou membránu. Poté je aktivován Munc-13-1, který katalyzuje přenos syntaxin-1-Munc-18-1 komplexu na SNARE komplex (Ma et al., 2011; Burgoyne et al., 2009). Mimo jiné tyto proteiny zabraňují inaktivaci synaptických vezikul způsobené NSF (z angl. N-ethylmaleimide-sensitive factor; He et al., 2017).

Další rodinou regulátorů SNARE jsou synaptotagminy nacházející se u živočichů na synaptických váčcích. Regulují fúzi v neuronech předního mozku. Obsahují cytoplazmatické C2 domény, které fungují jako Ca^{2+} senzory, a zároveň se vážou na t-SNARE a fosfolipidy v plazmatické membráně. V nepřítomnosti vápenatých iontů blokuje

synaptotagmin sestavení SNARE komplexu. Po vstupu Ca^{2+} indukuje synaptotagmin ohnutí obou membrán určených k fúzi. Synaptotagmin nicméně nepracuje sám a ke svému působení potřebuje komplexin jako kofaktor. Komplexin funguje pozitivně jako aktivátor fúze, ale také negativně jako svorka, která blokuje fúzi před vápníkovým signálem (Südhof, 2013; Gerst 2003). I když není pro správnou fúzi nutný, zvyšuje uvolňování neurotransmiteru o 60-70 % (Hu et al., 2009). Rostlinné synaptotagminy se strukturně podobají živočišným a také jejich membránová lokalizace napovídá jejich podobnou funkci. Synaptotagmin1 je zřejmě zapojen do udržování integrity plazmatické membrány v průběhu např. osmotického stresu (Schapire et al., 2008).

K udržení kontinuální dopravy včků a vůbec celé architektury buňky je nutný systém recyklace. Tu zajišťují SNAP proteiny, zahrnující tři izoformy označovány jako α -, β -, γ SNAP, a NSF. NSF interaguje se SNARE komplexem skrze SNAP proteiny a po jím katalyzované hydrolýze ATP se komplex rozpadne.

Genomy jednoděložných a dvouděložných rostlin kódují překvapivě mnoho SNARE proteinů ve srovnání s jinými eukaryoty, proto lze SNARE proteiny zařadit mezi životně důležitou třídu proteinů vyšších rostlin (Lipka et al., 2007). Mezi rostlinně specifické SNARE proteiny patří pouze SYP7 a NPSN. Protein NPSN interaguje s Qa-KNOLLE a hraje roli v cytokinezi (Di Sansebastiano et al., 2009). SYP7 byl lokalizován v ER. Obsahuje aktin vázající domény, pomocí kterých kotví membránu ER s aktinovými filamenti a zajišťuje tak pohyb ER pomocí kterého vzniká cytoplazmatické proudění (Cao et al., 2016). SNARE proteiny hrají roli v cytokinezi, gravitropismu stonku, symbióze, obraně před patogenem nebo se účastní reakce na abiotický stres (Lipka et al., 2007).



Obr. č. 1: (A) SNARE komplex se skládá ze čtyř α -helikálních domén – dvou Q-SNARE (syntaxin a SNAP25) a jedné R-SNARE (synaptobrevin). Regulace SNARE cyklu (B). Cyklus je zahájen navázáním proteinu Sec na Ha-Hb-Hc domény, čímž uvolňuje syntaxin z uzavřené konformace. Během fúze se trans-SNARE komplexy mění na cis-SNARE komplexy, protože společně zůstávají na jedné membráně. Disociaci cis-komplexů a recyklaci proteinů zajišťuje α -SNAP společně s NSF (dle Pratelli et al., 2004).

1.3. Tomosyny

Tomosyn je 130 kDa velký protein, který byl poprvé objeven jako interaktor syntaxinu-1. Od toho získal i svůj název, který se dá přeložit doslova jako „přítel syntaxinu“ (jap. tomo=přítel a syn=syntaxin) (Fujita et al., 1998). Později byl objeven i jeho paralogní gen tomosyn-2 (Groffen et al., 2005). Tomosyn-1 má tři isoformy vzniklé alternativním sestřihem, konkrétně m-tomosyn (původně objevený), menší s-tomosyn a větší b-tomosyn. Tomosyn-2 má čtyři alternativní sestřihy nazvané xb-, b-, m- a s-tomosyn-2. Exprese jednotlivých izoform tomosynu-1 se liší, m-tomosyn a s-tomosyn je exprimován převážně v mozku, kdežto b-tomosyn se nachází v různých tkáních např. v srdci, mozku, játrech, ledvinách nebo varlatech (Yokoyama et al., 1999; Groffen et al., 2005). Nicméně se později

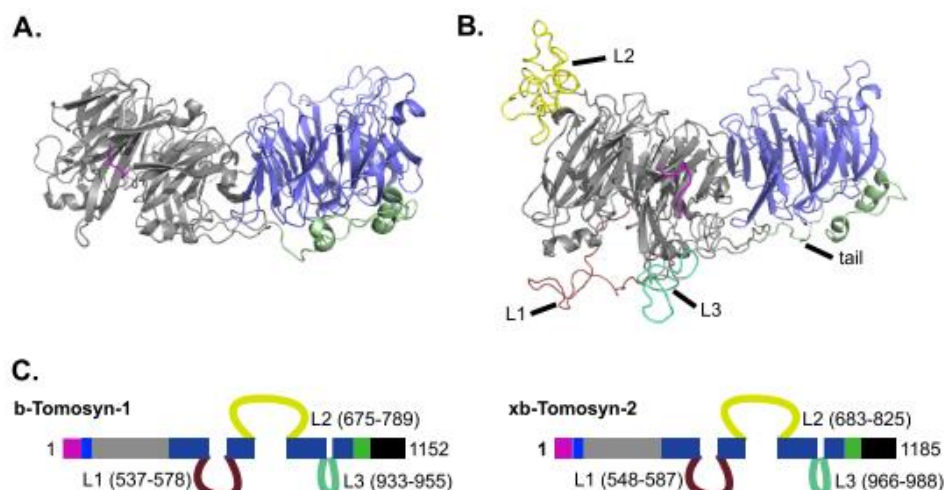
ukázalo, že toto rozdělení exprese není úplně přesné, protože v endokrinních - buňkách pankreatu byly nalezeny všechny tři izoformy tomosynu-1 (Zhang et al., 2006; Cheviet et al., 2006). V SCG tomosyn částečně kolokalizuje s markery synaptických vezikulů a aktivní zóny, což naznačuje presynaptickou lokalizaci (Baba et al., 2005). V pozdější studii byla dokázána také postsynaptická lokalizace tomosynu-2 (Barak et al., 2010). Žádná izoforma tomosynu neobsahuje transmembránovou doménu, takže se jedná o cytosolický protein (Pobbati et al., 2004). Zároveň však bylo zjištěno, že asociuje se synaptickými vezikuly, granulemi obsahujícími inzulin a skrze syntaxin se lokalizuje také na PM (McEwen et al., 2006; Cheviet et al., 2006; Widberg et al., 2003).

1.3.1. Struktura tomosynu

Tomosyn patří mezi R-SNARE proteiny, protože jeho C-terminální část je homologní se stejnojmennou subrodinou SNARE proteinů. A podobně jako synaptobrevin je tomosyn schopen pomocí této části interagovat se syntaxinem a vytvářet inaktivní tomosyn-SNARE komplex (Masuda et al., 1998). Tímto krokem tak zamezí interakci synaptobrevinu se SNARE proteiny (Hatsuzawa et al., 2003). V roce 2004 byla izolována krystalová struktura jádra tomosyn-SNARE komplexu, která odhalila téměř totožnou strukturu jako synaptobrevin-SNARE komplex. Jediné rozdíly se nacházely na povrchu struktury, kdy bylo omezeno interakci s komplexem, které se normálně s vysokou vazebnou afinitou vážou na synaptobrevin-SNARE komplex. Je pravděpodobné, že tomosyn na povrch komplexu rekrutuje jiné modulační faktory (Pobbati et al., 2004).

Před R-SNARE doménou se nachází krátká polypeptidová sekvence nazvaná koncová doména, která reguluje aktivitu tomosynu pomocí vazby na jeho C- nebo N-terminální doménu. Navázáním koncové domény na C-terminální doménu znemožňuje jeho interakci s t-SNARE, tento konformační stav se označuje jako stav II a nemá inhibiční aktivitu ve vztahu ke SNARE komplexům. Naopak inhibiční aktivita je obnovena ve stavu I, kdy se koncová doména naváže na N-terminální WD40 doménu a umožní tak interagovat C-terminální R doméně tomosynu s t-SNARE proteiny. Nicméně bylo také zjištěno, že přítomnost koncové domény do určité míry snižuje inhibiční aktivitu tomosynu dosud neupřesněným mechanismem, protože na interakci VLD (VAMP-like domain tj. R doména

tomosynu) s t-SNARE nemá žádný vliv (Yamamoto et al., 2010). Vazebná afinita koncové domény k N-terminální WD40 doméně je silnější než k C-terminální doméně, proto je stav I pravděpodobně dominantní. Jako pravděpodobný regulátor konformační změny mezi stavy I a II se jeví PKA (Yamamoto et al., 2009).



Obr. 2: Obrázek A. reprezentuje krystalovou strukturu Sro7, která zahrnuje N-terminální (fialově) a C-terminální doménu (zeleně). Obrázek B. reprezentuje model m-tomosynu-1 vytvořený na základě struktury Sro7. V jeho struktuře jsou patrné tři smyčky (L1, L2 a L3). Na obrázku C. jsou schémata dvou nejdelších isoform tomosynu u myši, ty obsahují dvě β -vrtulové struktury (šedě a modře), koncovou doménu (zeleně), R-SNARE doménu (černě) a tři smyčky (dle Williams et al., 2011).

N-terminální doména obsahuje několik WD40 motivů, které jsou složeny do jakýchsi lopatek a společně vytvářejí β -vrtulovou (z angl. propeller) strukturu (Pobbati et al. 2004). WD40 doména navíc obsahuje nestrukturované smyčky vyčnívající z β -vrtulové struktury, které se podílejí na lokalizaci tomosynu a jeho organizaci na PM. Delece smyček 2 a 3 eliminuje inhibiční aktivitu tomosynu, avšak interakce se syntaxinem1A zůstává silná. Později bylo zjištěno, že zprostředkovávají vazbu tomosynu na SNARE protein SNAP25. Smyčky tedy fungují jako nezbytný regulační element proteinu (Williams et al. 2011; Bielopolski et al., 2014). N-terminální doména také katalyzuje oligomerizaci SNARE komplexu pomocí přímé interakce WD40 domény se SNAP-25 a syntaxinem-1. Tato oligomerizace inhibuje přenos neurotransmiterů a dokazuje, že za inhibiční aktivitou

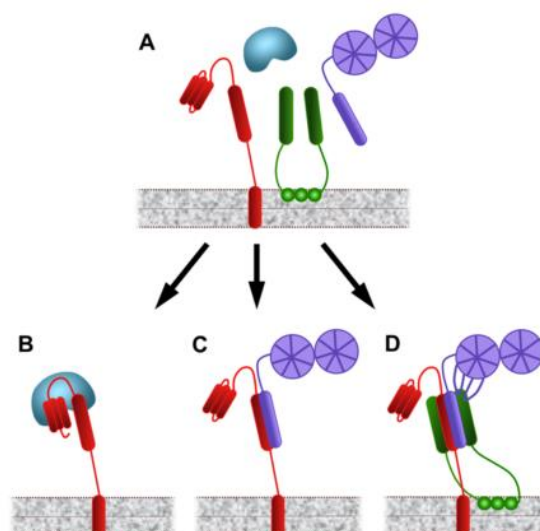
tomosynu nestojí pouze C-terminální R-SNARE doména (Sakisaka et al., 2008). To ostatně dokazuje i pokus s nadprodukcí mutantního proteinu postrádajícího N-terminální doménu. Mutantní tomosyn byl schopen interakce se syntaxinem, avšak nevykazoval inhibici exocytózy. Pro inhibiční funkci tomosynu je zásadní také integrita WD40 domény (Yizhar et al., 2007). N-terminální WD40 doména se také váže na synaptotagmin a touto vazbou se zvyšuje aktivita C-terminální domény. Tato vazba je závislá do značné míry na přítomnosti Ca^{2+} , což naznačuje, že synaptotagmin-1-tomosyn komplex vzniká až po vstupu Ca^{2+} do buněk (Yamamoto et al., 2010). Kromě tohoto bylo také zjištěno, že N-terminální doména je nutná k cílení tomosynu do míst fúze (Yu et al., 2014).

HVR (hypervariable linker) doména se nachází mezi doménami WD40 a R-SNARE. Tuto doménu obsahují všechny izoformy tomosynu-1 a tomosynu-2 a je to oblast v níž se jednotlivé izoformy liší (Groffen et al., 2005). Jedná se o důležitou regulační část proteinu. Nachází se zde smyčka 2 s fosforylačním místem v pozici Ser-724, které je cílem PKA (Baba et al., 2005). Toto fosforylační místo neobsahují izoformy s- a m-tomosynu-2 a s-tomosyn-1. Kromě fosforylačního místa se u b- a m-tomosynu-1 nachází v pozici Lys-730 sumoylační místo. Mutace v sumoylačním místě vedla ke zvýšení inhibice sekrece, interakce tomosynu s Q-SNARE zůstala beze změny. Smyčka 2 nemá vliv na inhibiční aktivitu tomosynu, avšak u tomosynu-2 ovlivňuje rozsah jeho akumulace (Williams et al., 2011).

1.3.2. Role tomosynu v exocytóze

Tomosyn byl původně objeven jako interaktor syntaxinu-1, kdy byl schopen disociovat komplex Munc-18-syntaxin-1 a vytvářet nový komplex složený ze syntaxinu-1, SNAP-25 a tomosynu. Tento komplex byl původně považován za katalyzátor přenosu neurotransmiterů, nicméně se později ukázalo, že tomosyn naopak exocytózu inhibuje (Fujita et al., 1998; Hatsuzawa et al., 2003). Redukce exocytózy tomosynem byla prokázána v neuronech i v neurosekrečních buňkách, tomosyn zde inhibuje konkrétně priming fázi vezikul.

Obr. 3: Model popisující inhibici tomosynem. Tomosyn (fialově) je cytosolický protein interagující na membráně se syntaxinem (červeně) a SNAP25 (zeleně). Syntaxin je schopen interagovat také s Munc18 (modře). Tomosyn je schopen tvořit se syntaxinem dimer a konkurovat tak Munc18 (B) nebo spolu se syntaxinem a SNAP25 vytváří ternární komplex (C) (dle Bielopolski et al., 2014).



Naproti tomu existují také studie, kdy tomosyn ovlivňoval exocytózu pozitivně. Příkladem jsou β -buňky pankreatu, kde je tomosyn asociován s granuly inzulínu. Zatímco nadprodukce tomosynu nemá výrazný vliv na sekreci inzulínu, utlumení aktivity tomosynu pomocí RNAi způsobilo částečnou inhibici exocytózy, kdy zachycená granula fúzí pomaleji, ale jejich počet ovlivněn není (Cheviet et al., 2006). Podobný výsledek byl pozorován i v SSG, kdy snížení množství tomosynu způsobilo pokles uvolňování neurotransmiteru (Baba et al., 2005). V adipocytech se b-tomosyn váže na syntaxin-4 svojí R doménou a jeho overexprese inhibuje inzulínem regulovaný přenos GLUT4 na povrch membrány. Bylo ukázáno, že s větší afinitou se b-tomosyn přitom váže na komplex syntaxin-4/SNAP23 nebo syntaxin-4 než na samotný SNAP23. Také bylo zjištěno, že Munc18 je schopen interagovat jak s komplexem tomosyn-syntaxin-4, tak také se syntaxinem-4, který je součástí SNARE komplexu (Widberg et al., 2003).

Genetickým mapováním bylo zjištěno, že tomosyn-2 je inhibítozem inzulínové sekrece. Tomosyn-2 hypoteticky funguje tak, že jakmile klesne hladina glukózy, tomosyn-2 zablokuje exocytózu a zabrání hypoglykémii. V myších liniích exprimujících BTBR alelu (náchylnost pro diabetes 2. typu) je zvýšené množství mRNA tomosynu-2, což je zřejmě důsledkem zvýšené stability tomosynu-2 obsahující SNP v AK 912 (Bhatnagar et al., 2011). Další studie ukazuje, že tomosyn-2 inhibuje exocytózu také v buňkách PC12 (Williams et al., 2011). Tomosyn-1 negativně reguluje sekreci arginin-vazopresinu v AVP neuronech,

tomosyn-2 zde nebyl detekován. Nadprodukce tomosynu-1 i snížení jeho množství pomocí siRNA má však jen omezené účinky, proto se nepředpokládá, že by byl hlavním regulátorem exocytózy v těchto typech buněk (Takeuchi et al., 2016). Funkce tomosynu byla studována také v chromafinních buňkách. Stimulace sekretagogem způsobuje rapidní translokaci tomosynu z cytosolu na PM, kde interaguje se syntaxinem-1A. Tato vazba je pak regulována Rho-asociovanou kinázou (kap. Regulace tomosynu) (Gladysheva et al., 2007). V živých buňkách dřeni nadledvin byla také měřena dynamika vezikulů pomocí TIRF mikroskopie. V normálních buňkách jsou vezikuly před fúzí imobilizovány, ale u buněk nadprodukcujících tomosyn je imobilizace potlačena, naopak se zvyšuje fluktuace vezikulů blízko PM a zeslabuje se fúze nové přichozích vezikulů. Tomosyn tak reguluje imobilizaci vezikulů, která je nutná pro úspěšný priming (Yizhar a Ashery, 2008). Spolupráce tomosynu s Munc-18 a Munc-13 zajišťuje přesnou regulaci exocytózy v tomto kroku. Tomosyn inhibicí SNARE komplexu docílí akumulace vezikulů v místech fúze a zabraňuje jejich náhodnému fúzování. Munc-18 pak s asistencí NSF a α -SNAP způsobí uvolnění tomosynu a tím umožní vazbu Munc-13 a synaptobrevinu (Li et al., 2018).

Společně s Rab3, Rab27, rabphilinem3a, Munc18 a CAPS je tomosyn jedním z těch proteinů, které jsou asociovány s vezikuly dlouhou dobu před exocytózou a v momentu fúze se pak rozptýlí pryč (Trexler et al., 2016). S vezikuly tomosyn interaguje prostřednictvím C i N-terminální domény. Tomosyn kolokalizuje s SV i DCV, přičemž typy vazeb se na jednotlivé typy vezikulů liší. Na rozdíl od Sro7 a tomosynu u *C. elegans*, savčí tomosyn nereguluje aktivitu motorových proteinů v neuronech hipokampu (Geerts et al., 2017).

Tomosyn dále svou aktivitou ovlivňuje vývoj neuritů, paměť, motoriku nebo byl studován v souvislosti s epilepsií. V neuritech se vezikuly nacházejí v jejich výbězcích, trnech, kde fúzují s plazmatickou membránou, což způsobuje růst neuritů. Navázáním tomosynu na fosforylovaný syntaxin se inhibuje fúze a neurity se smršťují. Nadprodukce tomosynu inhibuje vývoj, naopak utlumení tomosynu pomocí RNAi způsobí jejich nadměrný růst. Také se objevuje zvýšená hustota dendritických trnů, ale délka a objem hlavy trnu zůstává nezměněná. Naopak utlumení tomosynu má za následek sníženou hustotu dendritických trnů. Vliv tomosynu-1 na dendritické trny je nezávislý na C-terminální doméně (Sakisaka et al., 2004; Saldate et al., 2018).

V souvislosti s pamětí byl tomosyn studován v houbových tělesech, která lze označit jako centrum paměti u hmyzu. U *D. melanogaster* byl hodnocen výkon paměti po averzivním čichovém podmiňování, kdy bylo zjištěno, že po utlumení tomosynu byla dlouhodobá paměť snížena o 50 %. Krátkodobá paměť nebyla ovlivněna. Tomosyn-1 je nutný při učení a ukládání informací do paměti také u myši. Jeho overexprese v myším hipokampu způsobuje zhoršené kognitivní schopnosti (Chen et al., 2011; Barak et al., 2013). Mutace tomosynu-1 jsou spjaté také s poruchami autistického spektra a mentální retardací (Davis et al., 2009; Cukier et al., 2014). Ztráta tomosynu způsobuje zvýšené uvolňování glutamátu v gyru dentatu evokované KCl. Každá stimulace pravděpodobně způsobuje větší uvolnění glutamátu, což vede ke zrychlení procesu kindlingu, což je charakterizováno jako progresivní zesilování odpovědi neuronu na opakovanou stimulaci a je spjat s epilepsií (Batten et al., 2017). Tomosyn-2 je také potřeba pro správnou motoriku a udržování neurotransmise v nervosvalové ploténce. Mutantní myši postrádající tomosyn-2 vykazují sníženou motoriku způsobenou synaptickými změnami v nervosvalové ploténce, kdy je uvolňování acetylcholinu zvýšené a spontánní, což způsobuje rychlé vyčerpání RRP (Geerts et al., 2015).

1.3.3. Studium tomosynu u *Caenorhabditis elegans*

Genom *C. elegans* kóduje jeden gen tomosynu, který má 3 izoformy, přičemž izoforma TOM-1B postrádá celou N-terminální WD40 doménu. Neurotransmisi v nervosvalové ploténce zvyšuje ztráta izoform TOM-1A a TOM-1B (Gracheva et al., 2006). Výsledek potvrzuje i jiná studie, která dokázala citlivost tom-1 mutantů na aldikarb, což svědčí o zvýšeném cholinergním přenosu (Dybbs et al., 2005). U *C. elegans* je uvolňování neuropeptidů podporováno proteinem UNC-31, ortologem CAPS. Studium dvojité mutantů *tom-1/unc-31* ukázalo, že mutanti *tom-1* částečně potlačují akumulaci DCV způsobenou ztrátou UNC-31. Ultrastrukturální analýza mutantů také odhalila, že tomosyn negativně reguluje velké synaptické vezikuly. Synapse tom-1 mutantů mají až o 50 % méně DCV, při nadprodukci tomosynu se DCV akumulují. Naopak synaptické vezikuly mohou být okamžitě recyklovány a udržovat tak tempo zvýšené exocytózy při absenci tomosynu, proto je jejich množství v synapsích nezměněné (Gracheva et al., 2007). Na růst neuritů a

synaptogenezi ztráta tomosynu nemá vliv. Dále je u *tom-1* mutantů patrná opožděná postsynaptická odpověď, což je zřejmě způsobeno lokalizací vezikul, které se nacházejí distálně od aktivní zóny. Mechanismus negativní regulace primingu vezikul je stejný jako u tomosynu obratlovců a to vytvořením komplexu mezi SNARE a C-terminální doménou tomosynu (Gracheva et al., 2006). V motorických neuronech *C. elegans* je cílení tomosynu regulováno skrze UNC-104, homolog KIF1A, fungující jako motor vezikul (McEwen et al., 2006).

1.3.4. Regulace tomosynu

Interakce tomosynu se syntaxinem je regulována pomocí proteinkinázy A, která je aktivována PACAP. PKA fosforyluje tomosyn v pozici Ser-724, což způsobí zablokování vazby tomosynu na syntaxin-1. Fosforylovaný tomosyn umožní zvýšenou tvorbu SNARE komplexu, následně se zvýší také množství synaptických váčků v RRP a zesílí se uvolnění neurotransmiterů (Baba et al., 2005). Naopak inhibiční účinek tomosynu oslabuje zvýšená koncentrace Ca^{2+} (Yizhar et al., 2003). Také inzulinové sekretagogy (glukóza, forbol estery a analogy cAMP) ovlivňují obrat proteinu, konkrétně tomosynu-2. Při jejich vysoké koncentraci je v β -buňkách pankreatu tomosyn fosforylován a degradován ubikvitin-proteazomovým systémem. Za degradaci tomosynu-2 je zodpovědná E3 ligáza Hrd-1. Přesné ubikvitinační místo je neznámé, ale pravděpodobně se jedná o pozici Lys-801 a Lys-804. Neschopnost β -buněk degradovat tomosyn-2 vede ke snížené sekreci inzulinu, která přispívá k diabetu 2. typu. Stejná ligáza reguluje také množství tomosynu-1 a jeho vliv na morfologii dendritických trnů (Bhatnagar et al., 2014; Saldate et al., 2018). Tomosyn je také substrátem kináz Akt1 a Akt2, které v kosterních svalech a tukových tkáních regulují dopravu a fúzi vezikulů s GLUT4 (glukózový transportér). Fosforylace b-tomosynu-1 v místě Ser-783 těmito kinázami inhibuje interakci se syntaxinem-4, což umožňuje vazbu vezikulu s GLUT4 s t-SNARE komplexem (syntaxin-4 a SNAP-23) a následnou fúzi. Při nadprodukci tomosynu byla pozorována 10% redukce GLUT4 translokace (Nagano et al., 2015). Tomosyn prostřednictvím fosforylace cyklin-dependentní kinázou 5 (Cdk5) hraje roli v distribuci synaptických vezikul mezi presynaptickými hotovostmi (z angl. pool) TRP a ResP. Tato distribuce je nezávislá na C-terminální doméně tomosynu, proto se předpokládá

interakce s dosud neidentifikovaným efektem prostřednictvím N-terminální domény tomosynu. Takovým efektem může být Rab3A, který se ve své aktivované formě váže na tomosyn. Tomosyn spolu s Rab3A-GTP vytváří komplex se synapsinem 1, avšak tvorba komplexu je podmíněna fosforylací tomosynu. Tento komplex asociovaný se synaptickými vezikuly je důležitý pro omezení uvolňování SV. Knockdown tomosynu způsobil usnadnění uvolňování SV z RRP a regulaci distribuce synaptických vezikul do TRP a pokles SV v ResP (Cazares et al., 2016).

Dalším regulátorem interakce tomosynu se syntaxinem je ROCK (Rho asociovaná serin/threoninová kináza). ROCK, aktivovaná kyselinou lysofosfatidovou, fosforyluje syntaxin v pozici Ser-14. K fosforylovanému syntaxinu se tomosyn váže s 5x větší afinitou, což zvyšuje inhibiční efekt tomosynu (Gracheva et al., 2006; Sakisaka et al., 2004). Interakce mezi tomosynem a syntaxinem je ovlivněna také NEM, inhibítozem NSF. Inhibice aktivity NSF zvyšuje četnost interakcí tomosynu se syntaxinem na PM, na druhou stranu v adipocytech NEM způsobuje uvolnění b-tomosynu z PM do cytosolu. Koordinovaná aktivita NSF a LPA mění kinetiku tomosynu se SNARE komplexy a kontroluje tak aktivitu tomosynu (Gladysheva et al., 2007; Widberg et al., 2003).

Jak už bylo zmíněno, HVR doména tomosynu obsahuje také sumoylační místo a tato posttranslační modifikace redukuje inhibiční aktivitu tomosynu. Kvasinkovým dvojhybridním screeningem bylo zjištěno, že za připojením SUMO proteinu (Small Ubiquitin-related Modifier) na tomosyn stojí E3 ligáza PIAS. Interakce se účastní C-terminální doména tomosynu-1 a N-terminální doména PIAS. Tomosyn-1 je preferenčně modifikován SUMO-2/3 isoformou, pravděpodobně v pozici K730. Velká část izoform (s-tomosyn-1 tomosyn-2, lgl, SRO7/77) sumoylační místo nemá, proto se nepředpokládá, že by sumoylace měla vliv na bazální funkci tomosynu (Geerts et al., 2014).

1.4. Lgl rodina

Kvasinkové homology tomosynu patřící do rodiny lgl jsou Sro7 a jeho paralog Sro77. Lgl je rodina tumor supresorových genů, které regulují buněčnou polaritu v epitelových buňkách, jejich inaktivace vede ke ztrátě bazálně -apikální buněčné polarity a buňky již

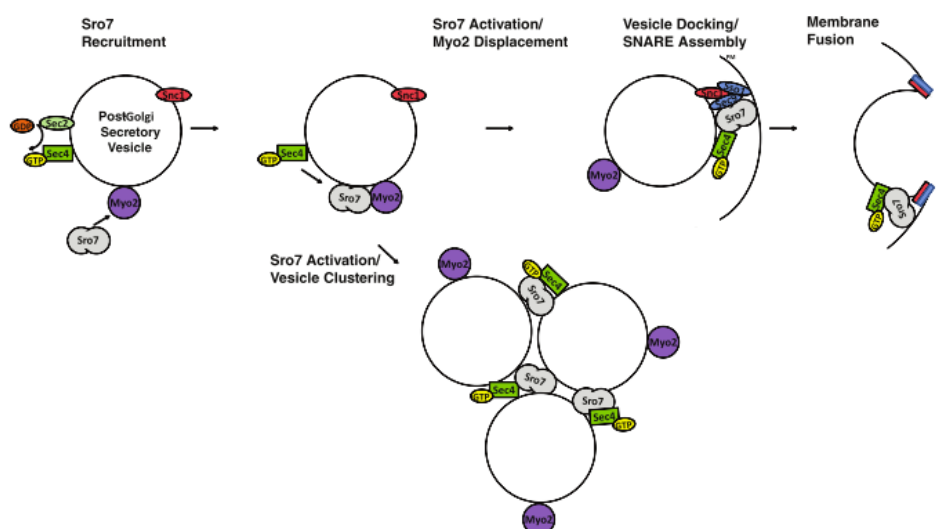
nadále nejsou schopny se diferencovat (Cao et al., 2015). Sro7/77 byly poprvé identifikovány jako supresory rho3 mutantů. Rho3 je GTPáza zodpovědná za organizaci aktinu a polarizovanou exocytózu (Kagami et al., 1998) a protože sro7/sro77 mutanti vykazovali defekt v sekreci váčků, tak se brzy ukázalo, že tyto proteiny hrají roli v pozdní fázi exocytózy (Lehman et al., 1999). Kromě akumulace váčků mutanti projevují i zvýšenou citlivost na chladnou teplotu a zvýšenou koncentraci NaCl (Lehman et al., 1999; Wadskog et al., 2004). Citlivost buněk na zvýšenou koncentraci NaCl je zapříčiněno špatným cílením proteinu Ena1p na membránu. Ena1p je sodíková ATPáza zajišťující homeostázi při osmotickém stresu, při deleci proteinů Sro7/77 je Ena1 degradována ve vakuole. Sro7/77 jsou nutné ke správnému cílení Ena1p na membránu (Wadskog et al., 2004, 2006). Kromě cílení Ena1p se Sro7 podílí na cílení vezikulů s chitinsyntázou Chs3p do krčku pupene a zajišťuje jejich správnou fúzi, konkrétně v pozdější fázi při cytokinezi. Ačkoli je Sro77 z 54% identický se Sro7, nehraje v tomto procesu takovou roli (Zanolari et al., 2011).

1.4.1. Struktura Lgl proteinů

Nejlépe probádaným zástupcem Lgl rodiny je kvasinkový homolog Sro7p. Struktura Sro7p se skládá ze 14 WD40 motivů, které se skládají do sedmičlenných beta-vrtulových struktur (struktury připomínající vrtuli letadla) tvořících C a N-terminální domény, a konce složeného z 60 aminkokyselin. Sro7/77 neobsahuje na svém C-terminálním konci R-SNARE doménu typickou pro tomosyny. Při bližším prozkoumání bylo však zjištěno, že na C konci mají heptadovou repetici, která zjevně z R-SNARE motivu pochází (Pobbati et al., 2004). C-terminální koncová doména je vázána na hydrofilní povrch N-terminální domény. Podobně jako tomosyny i Sro7 tak existuje ve dvou konformačních stavech s rozdílnou afinitou pro koncovou C-terminální doménu, "otevřená" konformace má nižší afinitu pro C-terminální konec a umožňuje tak navázání Sec9p a následnou tvorbu SNARE komplexů. Rovnováha mezi těmito stavy je ovlivněna dalšími faktory regulujícími aktivitu Sro7. Alignment s tomosynem ukázal konzervaci v N-terminální doméně, ale i v C-terminální koncové doméně, což naznačuje podobné fungování obou proteinů (Hattendorf et al., 2007).

1.4.2. Jak reguluje Sro7/77 exocytózu

Jako jeden z prvních interaktorů Sro7 byl identifikován Myo1, myosin typu II, který hraje roli při buněčném dělení a tvorbě primárního septa a Myo2p, myosin typu V, který funguje jako „motor“ váčků a pomocí něhož se pohybují ve směru polarizovaného růstu (Kagami et al., 1998; Rossi a Brennwald, 2011). V předpokládaném modelu Myo2p rekrutuje Sro7p na povrch post-Golgi vezikulů, Sro7p se naváže na IQ motiv v oblasti krčku proteinu Myo2p a zůstává neaktivní do chvíle, než dorazí na cílovou membránu. V cíli se Myo2p odpojí a umožní Sro7p ve spojení s Rab GTPázou Sec4p zahájit fúze membrány vezikulu s plazmatickou membránou. Příčinou odpojení může být interakce Sro7p se Sec9p, podjednotkou komplexu exocyst Exo84p, nebo obou zároveň. Myo2p tedy reguluje Sro7p jak pozitivně, kdy podporuje cílení Sro7p do místa aktivního růstu, ale také negativně, kdy interakcí se Sro7p zamezuje shlukování vezikulů (Rossi a Brennwald, 2011).

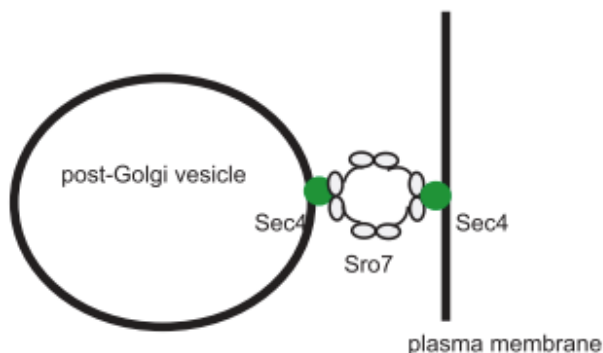


Obr. 4: Předpokládaný model regulace Sro7 proteinem Myo2p. Vazbou proteinu Sro7p na Myo2p se kvasinkový homolog tomosynu inaktivuje, lokalizuje na povrch plazmatické membrány. Vazba Sro7 na IQ motiv Myo2p zároveň zamezuje shlukování vezikul (dle Rossi a Brennwald, 2011).

Sro7p funguje současně jako upstream efektor proteinu Sec9p a reguluje jeho aktivitu. Tomu napovídá i lokalizace obou proteinů, tedy v cytosolu nebo asociovaný s plazmatickou membránou (Lehman et al., 1999). Sec9p je kvasinkový homolog proteinu SNAP-25 a spolu s proteiny SNC1p a SNC2p, nacházejících se na vezikulech, a SSO1p a

SSO2p, nacházejících se na plazmatické membráně, vytvářejí SNARE komplex zajišťující fúzi váčků (Brennwald et al., 1994). Sec9p nemá, na rozdíl od SSO1p nebo SSO2p, transmembránovou doménu nebo palmitoylační místo, díky kterému by bylo schopno zakotvit v plazmatické membráně, proto je jedna z rolí Sro7p lokalizovat Sec9p na plazmatickou membránu (Hattendorf et al., 2007). Interakce Sro7p se Sec9p funguje tak, že doména Sec9-Qbc je navázána na N-terminální část Sro7p a autoinhibiční doména proteinu Sro7p je tak v "otevřené" konformaci. Při spuštění příslušného signálu se autoinhibiční doména naváže zpátky na N-terminální a uvolní tak Sec9-Qbc, která se následně účastní fúzování vezikulů (Rossi a Brennwald, 2011).

Pro schopnost Sro7p poutat vezikuly na membránu je nutná vazba Sec4p, což je malá GTPáza spadající pod rodinu Rab, která je součástí superrodiny Ras. Sec4 hraje roli ve vezikulárním transportu mezi Golgiho aparátem a plazmatickou membránou (Grosshans et al., 2006; Goud et al., 1988). Protože nebyla nalezena žádná přímá interakce mezi Sec4p a SNARE proteiny, působí Sro7p pravděpodobně jako downstream efektor Sec4p GTPázy a pravděpodobně přenáší signál na SNARE. Podobným efektozem je podjednotka poutacího komplexu exocyst Sec15p, což dokazuje existenci dvou paralelních signalizačních drah. Aby byl schopen Sro7p se navázat na Sec4p, musí být GTPáza v aktivovaném stavu, tedy s navázaným GTP (Grosshans et al., 2006). K vazbě přispívá jak N-terminální, tak i C-terminální doména proteinu Sro7p. Obě domény vytvářejí tzv. beta-vrtulovou strukturu a mezi nimi se nachází štěrbina, kam se váže Sec4p. Specifitu vazby u GTPázy Sec4 zajišťuje sekvence aminokyselin v tzv. switch I doméně, která interaguje s N-terminální doménou Sro7, zatímco tzv. switch II doména pravděpodobně hraje roli při rozeznávání aktivované GTPázy (Rossi et al., 2015). Vazba Sro7p na membránu vyžaduje přítomnost Sec4p jak na vezikulu, tak na PM. Sro7p má však pouze jedno vazebné místo pro Sec4p, proto při poutání vezikulů prochází Sro7 procesem homo-oligomerizace (Rossi et al., 2018).



Obr. 5: Sro7 jako efektor Sec4 GTPázy pomáhá při poutání váčků na plazmatickou membránu. Sro7p prochází procesem oligomerace, protože obsahuje pouze jedno vazebné místo pro GTPázu Sec4 (dle Rossi et al., 2018).

Sro7/77 je schopen poutat vezikuly také nepřímo pomocí interakce s podjednotkou exocystu Exo84p. Sro7/77 se váže na N konec proteinu Exo84p a narušení této vazby vede k defektu v exocytóze. Tato interakce pravděpodobně soustřeďuje exocytózu na specifické místo a zajišťuje tak polarizovaný růst, jelikož proteiny Sec9p nebo Sro7/77 jsou rozmístěny po celé plazmatické membráně, kdežto exocyst je koncentrován v místě tvorby pupene (Zhang et al., 2005).

Interaktory Sro7p jsou také Kin1/2, kvasinkové homology Par-1, což je kináza zajišťující ustanovení polarity v embryonální buňce. Interagují také se Sec9p a jejich hlavní funkcí je fosforylace tohoto proteinu, čímž regulují exocytózu. Fosforylací indukují zamezení nebo naopak uvolnění proteinu Sec9p z membrány a tím zajišťují dostupnost Sec9p k tvorbě dalších SNARE komplexů (Elbert, 2004).

1.5. Tomosyny u rostlin

Ačkoli byly tomosyny identifikovány v genomech řady rostlin (Sanderfoot, 2007), jejich funkční i strukturní analýza dosud zcela chybí

Cíl práce:

Cílem této diplomové práce je základní charakteristika obou homologů tomosynů rostliny *Arabidopsis thaliana*.

Dílčí práce zahrnovala:

- bioinformační a fylogenetickou analýzu AtTYN1 a AtTYN2
- tvorbu DNA konstruktů s N-terminálně fúzovaným GFP sloužících pro lokalizaci tomosynů a konstruktů použitých pro dvouhybridní kvasinkový systém
- hledání interaktorů pomocí dvouhybridního kvasinkového systému
- buněčná lokalizace rostlinných tomosynů

2. Materiál a metody

2.1. Média

SD	6.7 g yeast nitrogen base (Sigma) 1,94 g -WLHA; 1,6 g -WL; 1,92 g -W dropout mix (Sigma, Clontech) 50 ml 40% glukózy (Duchefa) - sterilizována filtrací, přidána po autoklávování 20 g rostlinného agaru (Duchefa) - pro přípravu ploten 950 ml ddH ₂ O upravena hodnota pH na 5.8 přidáním NaOH
YPAD	10 g bacto yeast extract (Oxoid) 20 g bacto peptone (Oxoid) 40 mg adenin (Bio Basic) 50 ml 40% glukózy (Duchefa) - přidána po autoklávování 20 g rostlinného agaru (Duchefa) - pro přípravu ploten 950 ml ddH ₂ O
2x YPAD	20 g bacto yeast extract (Oxoid) 40 g bacto peptone (Oxoid) 40 mg adenin (Bio Basic) 50 ml 40% glukózy (Duchefa) 950 ml ddH ₂ O
MPB	25 g živného bujónu č. 2 (Biolife) do 1 l ddH ₂ O
MPA	23 g živného agaru (Biolife) 10 g NaCl (Lach-Ner) do 1 l ddH ₂ O
LB	10 g bacto peptone (Oxoid) 5 g bacto yeast extract (Oxoid) 10 g NaCl (Lach-Ner) 17.5 ml rostlinného agaru (Duchefa) - pro přípravu ploten do 1 l ddH ₂ O

Tabulka 1: Použitá média k pěstování bakterií a kvasinek

Média byla autoklávována 20 min při 121 °C a 0,144MPa v autoklávu OmegaTMMedia. Po ochlazení na 60° byla do médií přidána příslušná antibiotika.

Antibiotikum	Zásobní koncentrace	Koncentrace v 1ml média
Ampicilin	100mg / ml ddH ₂ O	0.1 mg
Kanamycin	50 mg / ml ddH ₂ O	0.05 mg
Gentamycin	25 mg / ml ddH ₂ O	0.025 mg
Rifampicin	15 mg / ml metanolu	0.015 mg
Hygromycin	50 mg / ml ddH ₂ O	0.05 mg
Spectinomycin	50 mg / ml ddH ₂ O	0.05 mg

Tabulka 2: Používaná antibiotika a jejich koncentrace

2.2. Transformace

2.2.1. Stabilní transformace *Arabidopsis thaliana*

A. tumefaciens bylo transformováno elektroporací (2 kV/ 2 mm) vybraným vektorem a po selekci kolonií přes noc kultivováno ve 100 ml MPB média za stálého třepání ve 28°C. Bakteriální kultura byla v 50 ml falkonkách centrifugována 15 min při 3700 rcf a 4°C. Vzniklý pelet byl resuspendován nejprve ve zbytkové kapalině a pak bylo do něj přidáno 50 ml 5% sacharózy a smáčedlo Silwet L-77 (Ambersil Ltd. UK) do konečné koncentrace 0.05%, obsah byl promíchán. Ze zhruba 6 týdenních rostlin byly ostrženy všechny založené šesule a otevřené květy. Do připraveného roztoku byly namočené celé nadzemní části rostlin na cca 30 s. Rostliny byly přikryty plastovým sáčkem a ponechány ve tmě na 24 h. Poté byly plastové sáčky odstraněny a rostliny byly přeneseny do kultivační místnosti a pěstovány za standardních podmínek dlouhého dne. Pro zvýšení efektivity transformace byl celý proces po týdnu opakován. Potenciální transformovaná semena byla sterilizována a selektována pomocí antibiotik, příp. herbicidu BASTA.

2.2.2. Transientní transformace listu *Nicotiana benthamiana*

Kolonie *A. tumefaciens*, nesoucí vybrané konstrukty, byly kultivovány ve 2 ml MPB média přes noc na třepačce při 28°C. Kultura byla následně 5 min centrifugována při 2200 rcf, vzniklý pelet byl promyt v 1 ml infiltračního pufru (50 mM MES pH 5.6, 2 mM Na₂PO₄, 0.5% glukóza, 100 M acetosyringon). Kvůli co největšímu vymytí ATB byl vzorek opět stočen a resuspendován v 0.5 ml inokulačního média. Ze suspenze byl odebrán malý vzorek, který byl 50x zředěn a na spektrofotometru (BioMate 5, Thermo Spectronic) byla změřena jeho OD₆₀₀. Množství suspenze v IM s čerstvým inokulačním médiem byl naředěn tak, aby jeho výsledný objem činil 5 ml a OD₆₀₀ byla 0,1. Takto připravené inokulum bylo nabráno do 1 ml injekční stříkačky a lehkým opřením o list a tlakem infiltrováno do spodní strany listů. Aby se průduchy plně otevřely, byly listy 1 h před infiltrací intenzivně osvětlovány. Vedle *Agrobakterií* s fúzním konstruktem byly jako kontroly infiltrovány do listů také bakterie nesoucí konstrukt kódující volné GFP a bakterie nesoucí jen p19, protein potlačující

posttranskripční umlčování exprese. Infiltrované listy byly označeny nalepením papírové pásky na řapík. Po dvou dnech byly infiltrované sektory vystřiženy a připraveny jako preparát pro pozorování ve fluorescenčním mikroskopu.

2.3. Práce s DNA

2.3.1. Izolace plazmidové DNA

Pomocí sterilního párátka byla z natransformovaných buněk *E. coli* přenesena jedna kolonie do zkumavky se 4 ml MPB nebo LB média a příslušnými antibiotiky dle použitého plazmidu (v množství 1 µl/1 ml). Zkumavky s inokulem byly inkubovány za stálého třepání přes noc při 37°C. Druhý den byla bakteriální kultura cetrifugována 90 s při 14 000 rcf. K samotné izolaci byl použit High Pure Plasmid Isolation Kit (250) Cat. no. 11 754 785 001 (Roche) nebo GeneJET Plasmid Miniprep Kit cat. no. K0502 (Thermo Scientific). Výsledkem bylo 100 nebo 50 µl eluátu v elučním pufru (10 mM Tris-HCl; pH 8.5).

2.3.2. Izolace genomické DNA

Lístek z *Arabidopsis thaliana* o průměru 1 cm byl vložen do mikrozkušavky a rozemlet plastovým tloučkem. K rozemletému materiálu bylo přidáno 400 µl extračního pufru (200 mM Tris-HCl; pH 7.5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0.5 % SDS) a poté 300 µl chloroformu. Směs byla 1 min vortexována a cetrifugována 3 min při 14 000 rcf. Horní fáze byla opatrně přenesena do nové mikrozkušavky a do ní pak přidáno 300 µl isopropanolu. Suspenze byla ponechána 10 min při pokojové teplotě a poté cetrifugována 5 min při 14 000 rcf. Mikrozkušavky s peletem byly ponechány otevřené, dokud se nevypařily zbytky isopropanolu. Pelet byl rozpuštěn v 100 µl 4 mM Tris, pH 8.0.

2.3.3. Pomocí DNAzolu

Rostlinný materiál byl pomocí tekutého dusíku a tloučku rozdrcen v třecí misce. Homogenát byl přenesen do zkumavky obsahující rostlinný DNAzol (0.3 ml DNAzolu na 0.1 g rostlinného materiálu). Roztok byl promíchán a ponechán na třepačce 15 min při pokojové teplotě. Poté bylo do roztoku přidáno 300 µl chloroformu a opět za stálého třepání inkubován

dalších 5 min při pokojové teplotě. Následně byl centrifugován 10 min při 12 000 rcf. Supernatant byl přenesen do nové mikrozkušavky a k němu přidáno 225 µl 96 % ethanolu. Vzorek byl promíchán, inkubován 5 min při pokojové teplotě a centrifugován 5 min při 5 000 rcf. Mezitím byl připraven 300 µl roztok DNAzol-ethanolu (96 %) v poměru 4:3 a následně přidán k vysrážené DNA. Vzorek byl 5 min ponechán a poté centrifugován 4 min při 5 000 rcf. Pelet s DNA byl promyt 300 µl 75 % ethanolu a opět centrifugován. Mikrozkušavky s vysráženou DNA na dně zůstaly otevřené, aby se vypařily zbytky ethanolu. Pelet byl rozpuštěn v 70 µl TE pufru, pH 8.0.

2.3.4. Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) probíhala v termocykleru TPersonal (Biometra) nebo gradientovém termocykleru TGradient (Biometra). Používaly byly mikrozkušavky o objemu 200 µl. PCR reakce o objemu 50 µl byly připravovány na ledu, obsahovaly 0.5 µl Q5 polymerázy (0.02 U/µl), 10 µl 5x Q5 reakčního pufru, 1 µl dNTPs (10 mM), 0.5 µl templátové DNA, 0.5 µl předního primeru (100 µM), 0.5 µl zadního primeru (100 µM) a 37 µl ddH₂O.

Tyn1		Tyn2		Tyn1C		Tyn2C	
teplota [°C]	čas [s]	teplota [°C]	čas [s]	teplota [°C]	čas [s]	teplota [°C]	čas [s]
98	60	98	60	98	60	98	60
98	20	98	20	98	20	98	20
68	20	72	20	70	20	72	20
72	80	72	80	72	15	72	15
72	180	72	180	72	180	72	180

Tabulka 3: Nastavení termocykleru při amplifikaci tomosynu 1 a 2 a jejich C domén

Primer	Sekvence	Restrikční místo
AtTYN1 Fw Kpn	TTGGTACCTCGATGTTTCGTCAGAAAATTTCTGC	Kpn
AtTYN1 Rv Sal	TTTGTCGACGCAGCCTCAAATCAGCTCAC	Sal
AtTYN2 Fw Kpn	TTGGTACCAAGATGTTTCGTGAAGAAGTTGGTCG	Kpn
AtTYN2 Rv Sal	TTTGTCGACTTGTGGGATCTCTGAAGGAGAG	Sal
Atyn2_Rv1_sal	TTTGTCGACCTAAGATTTTGAGCTCTGTT	Sal
AtTYN1 seq1 fw	TCATCTCCTATTGATTATCCGG	-
AtTYN1 seq2 fw	ATCCAGGACAACCTGCAAGCATA	-
AtTYN1 seq3 fw	CTTTATCTCATGCTGTTGGTTC	-
AtTYN1 seq4 fw	TTGATCAGATATTTGCGAATTC	-
AtTYN1 seq5 fw Kpn	TTGGTACCAAGATGGCAGCAGCTGCTGACGCTAC	Kpn
AtTYN2 seq1 fw	TGGGACATCAAAGAAAGCAAAC	-
AtTYN2 seq2 fw	TTAAGCTGCCATTTTCAGATTC	-
AtTYN2 seq3 fw	AAACACATTGCAAGTGATATAT	-
AtTYN2 seq4 fw Kpn	TTGGTACCAAGATGTTCAAGACTAAATCAAAGCG	Kpn
fw_tyn2_int1	CAGATAGATCAAGATGT	-
rv_tyn2_int1	CTGTTCTTTTCAGAAACA	-
fw_tyn2_int2	TGTTTCTGAAAGAACAGCAGATAGATCAAGATGT	-
rv_tyn2_int2	ACATCTTGATCTATCTGCTGTTCTTTTCAGAAACA	-

Tabulka 4: Použité primery při PCR

K purifikaci PCR reakce byl využit High Pure PCR Product Purification Kit (250) cat. no. 11 732 676 001 (Roche) nebo byla reakce přečištěna agarózovou elektroforézou, fragmenty DNA byly vyříznuty skalpelem a vyextrahovány pomocí MinElute Gel Extraction Kit (250) cat. no. 28606 (Qiagen) nebo Monarch® DNA Gel Extraction Kit (250) cat. no. T1020L (New England Biolabs, Inc.).

2.3.5. Restrikce DNA

K restrikci DNA byly využívány restrikční endonukleázy II. typu. Běžné restriktázy (Fermentas) byly používány ke kontrolnímu štěpení, tedy zda se konkrétní sekvence do

určitého plazmidu zaklonovala správně. Konečný objem restriční reakce byl 20 μ l a skládal se z 2 μ l reakčního pufru (podle typu použité restriktázy), 0.5 μ l restriktázy, až 12 μ l DNA a ddH₂O doplněné do 20 μ l. Pro účely klonování byly používány High Fidelity (HF) restriktázy (NEB) kvůli vyšší přesnosti štěpení. Inkubace probíhala v termostatu při 37 °C od 1 h až přes noc. DNA byla vizualizována agarózovou elektroforézou.

2.3.6. Ligace DNA

Ligační reakce byla připravována na ledu. V mikrozkuhavce bylo smícháno 1 μ l T4 reakčního pufru, 0.5 μ l T4 DNA ligázy, 20-100 ng plazmidu, inzerční DNA a doplněno ddH₂O do 10 μ l. Mikrozkuhavka s ligační reakcí byla inkubována 20 min při 22 °C, následně do ní bylo přidáno 10 μ l chloroformu. Vzorek byl centrifugován 3 min při 14 000 rcf, do nové mikrozkuhavky byl opatrně přenesen supernatant, který byl uschován do -20 °C nebo 1 μ l použit při elektroporaci bakterií (2,5 kV/ 2 mm).

2.3.7. Gateway

Inzerční DNA byla zaligována do vstupního vektoru, který byl napórován do bakterií, namnožen a vyizolován. Následně byla připravena LR reakce, ve které bylo smícháno 0.5 μ l donorového vektoru, 0.5-3.5 μ l vstupního vektoru s inzerovanou DNA (max. 150 ng) a TE pufr do objemu 4 μ l. Poté byl do reakce přidán 1 μ l LR Clonase II enzym mixu, vzorek byl zvortexován a inkubován přes noc při 25°C. Druhý den bylo do reakce přidáno 0.5 μ l proteinázy K a vzorek přenesen na 20 min do termostatu s 37°C. Vzorek o objemu 1.2 μ l byl natransformován do kompetentních buněk a vyset na plotny s příslušnými antibiotiky.

2.3.8. Agarózová elektroforéza

Elektroforéza byla používána pro vizualizaci DNA, konkrétně velikost a přítomnost PCR produktů, kontrolního štěpení nebo purifikaci DNA. Běžně byl připravován 1% gel. V TBE pufru (10 mM Tris, 20 mM kyselina boritá, 1 mM EDTA, pH 8.0) byla smíchána agaróza v koncentraci 0,1 g/1 ml (Ultra Pure Agarose, Invitrogen) a rozpuštěna zahřátím v mikrovlnné troubě. Po ochlazení byla do rozpuštěné agarózy přidána fluorescenční barva GelRed v množství 1 μ l/ 1 ml a mícháním rozpuštěna. Roztok agarózy byl nalit do utěsněné vaničky s vhodnou velikostí hřebenu, gel tuhnul přibližně 30 min. Hřeben byl poté vybrán a vanička s gelem byla přemístěna do nádržky s TBE pufrem. Vzorky byly smíchány v poměru 1:5 s 6x Loading Dye (Fermentas) a napipetovány do jamek agarózového gelu. K určení přibližné velikosti DNA fragmentů sloužil DNA marker (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific), který byl v objemu 0.1-1 μ l napipetován do jedné z jamek. Elektroforéza probíhala při 90 V, dokud se fragmenty DNA patřičně nerozdělily. Výsledky byly zachyceny pomocí digitálního zobrazovacího systému G:BOX (Syngene) a programu GeneSnap (Syngene), případně byly fragmenty DNA skalpelem z gelu vyříznuty a vyizolovány.

2.3.9. Sekvenování

V 0.2 ml tenkostěnných mikrozkuvkách byla smíchána plasmidová nebo lineární DNA (maximálně 300 ng) spolu s 1 μ l sekvenčního primeru (5 μ M koncentrace) a k tomu bylo přidána ddH₂O do 8 μ L. Sekvenaci zajišťovala Laboratoř sekvenace DNA, PřF UK. V případě sekvenace společností Eurofins Genomics bylo do 1.5 ml mikrozkuvky napipetováno 5 μ L DNA o koncentraci 80-100 ng/ μ L a 5 μ L sekvenačního primeru o koncentraci 5 μ M. Výsledné chromatogramy byly analyzovány programem Geneious (Biomatters).

2.4. Pěstování rostlin a bakterií

2.4.1. Pěstování rostlinného materiálu

Při pokusech byly používány rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia (Col-0, WT rostliny). Před vysetím byla semena v mikrozkušavkách stratifikována v lednici při 4°C. Stratifikovaná semena byla vyseta na MS agarové plotny nebo sterilní rašelinové pelety (jiffy) a umístěna do kultivační komory, kde byla kultivována v podmínkách dlouhého dne (24 °C/ 16 hod světlo/ 8 hod tma).

2.4.2. Suchá sterilizace semen

Do mikrozkušavek byla v zapnuté digestoři přesypána semena. Otevřené mikrozkušavky byly položeny do exikátoru na bok, aby byla semena rovnoměrně rozprostřena po stěně mikrozkušavek. Do středu exikátoru byla dána kádinka s 50 ml neředěného roztoku SAVO (5 % NaClO), do které bylo přidáno 1.5 ml koncentrované HCl. Exikátor byl ihned uzavřen a semena byla tímto způsobem sterilizována 4-8 hodin.

2.4.3. Příprava kompetentních buněk

Nejdříve byly na Petriho misku s MPB zaočkovány kompetentní buňky *E. coli* (kmen DH5α) z laboratorních sbírek a uloženy na noc do termostatu (Qcell) při 37°C. Následující den byla do 10 ml MPB média přenesena sterilním párátkem jedna kolonie, která byla za stálého třepání přes noc inkubována při 37°C. Další den bylo inokulum přeneseno do 1 l MPB média a za stálého třepání při 37 °C pěstováno do doby, kdy OD₆₀₀ dosáhl hodnot 0.5–0.6 (měřeno oproti čistému MPB). Narostlá kultura byla rozdělena do 50 ml zkumavek a na 15 min uložena na led. Poté byla centrifugována 15 min při 4 °C a 3600 rcf. Pelet byl resuspendován v 1 l vychlazené ddH₂O a centrifugován při stejných podmínkách. Přechištěný pelet byl.

resuspendován v 0.5 l vychlazené ddH₂O a opět centrifugován 15 min při 4 °C a 3600 rcf. Podruhé přečištěný pelet byl resuspendován ve 20 ml 10 % glycerolu a změřeno OD₆₀₀ oproti čisté vodě. Buňky v glycerolu byly centrifugovány 15 min při 4 °C a 4600 rcf a pelet resuspendován v 2-3 ml 10 % glycerolu. Toto množství glycerolu bylo určeno podle hodnoty OD₆₀₀ tak, aby konečná koncentrace buněk byla vyšší než 3x10¹⁰ za předpokladu, že 10⁸ buněk má hodnotu OD₆₀₀ 0.1. Naředěná suspenze byla rozdělena do mikrocetrifugačních zkumavek po 50 µl a zmrazena tekutým dusíkem. Alikvoty byly následně skladovány v -80 °C.

2.4.4. Elektroporace bakterií

K transformaci kompetentních buněk *E. coli* nebo *Agrobacterium tumefaciens* byl použit přístroj Eporator (Eppendorf) nebo Gene Pulser Xcell (BIORAD). Nejdříve byly elektroporační kyvety vychlazeny na ledu, do nich bylo přeneseno 50 µl kompetentních buněk. Ke kompetentním buňkám bylo přidáno 1.3 µl DNA určené k transformaci. DNA byla vnesena do kompetentních buněk při 2500 V v případě *E. coli* nebo 2000 V u *Agrobacterium*. Po elektroporaci bylo ke kompetentním buňkám s DNA přidáno 500 µl MPB nebo LB média a necháno 1 h inkubovat při 37 °C (*E. coli*) nebo 3 h na třepačce při 28 °C (*Agrobacterium*).

2.5. Práce s kvasinkami

2.5.1. Transformace kvasinek

Den před plánovanou transformací bylo z plotny pomocí sterilní kličky inokulováno jednou kolonií 3 ml YPAD nebo SD-W/L média, které bylo kultivováno přes noc na třepačce při 37 °C. Narostlá kultura byla poté centrifugována 5 min při 700 rcf. Mezitím byla 5 min při 98 °C denaturována nosičová jednořetězcová DNA (10 mg/ml) a poté ponechána chvíli na ledu. Po centrifugaci kvasinkové kultury byl odsát supernatant, pelet byl resuspendován v 1 ml ddH₂O a znovu centrifugován 5 min při 700 rcf. Nosičová DNA byla opět denaturována a vortexována, supernatant byl po centrifugaci odsát a do peletu bylo napipetováno 12 µl

denaturované nosičové DNA, 2-3 μ l plasmidové DNA a 500 μ l PEG/LiAc roztoku (40 % PEG 3350, 0,1 M LiAc, 10x Tris-Cl pH 7.5). Následně byla směs 15 min inkubována na vortexu při pokojové teplotě a 300 ot. / min. Směs byla pak přenesena do termobloku nastaveného na 42 °C a po 10 min do ní bylo napipetováno 55 μ l 96% EtOH. Poté následovala opět inkubace 5 min při 42 °C a centrifugace 5 min při 700 rcf. Supernatant byl odsát a pelet resuspendován pomocí vortexu v 1 ml sterilní ddH₂O. Směs byla znovu centrifugována 5 min při 700 rcf, supernatant byl odsát a pelet resuspendován v 100-200 μ l ddH₂O. Takto připravené buňky byly vysety na selekční plotny.

2.5.2. Dvouhybridní kvasinkový systém

Dvouhybridní kvasinkový systém je metoda sloužící k testování interakcí. V této metodě se používají dva typy expresních vektorů, kdy jeden exprimuje vazebnou doménu transkripčního regulátoru LexA (Oliveira and Lindblad, 2005) a selekční auxotrofní marker a druhý exprimuje aktivační doménu transkripčního faktoru GAL4 (Traven et al., 2006) spolu se selekčním auxotrofním markerem. V případě, že spolu dva studované proteiny interagují, dojde k vazbě transkripčního regulátoru LexA na příslušnou sekvenci v promotoru reportérového genu a aktivační doména GAL4 umožní nasednutí RNA polymerázy a přepis reportérového genu. V tomto systému jsou reportérové geny auxotrofní markery, zajišťující kvasinkám růst na médiích bez histidinu a adeninu. Zde byly používány pGAD plasmidy s auxotrofním genem LEU2 a pLexA plasmidy s auxotrofním genem TRP1, kterými byly transformovány kvasinky kmene NMY51 (DualSystems). Z každé sekundární transformace byly vybrány dvě kolonie, které byly resuspendovány v 100 μ l ddH₂O. Suspenze byla následně zředěna v poměru 1:30, 1:900 a 1:27 000. Z každého vzorku bylo odpipetováno 15 μ l a vykápnuo na SD-TRP-LEU a SD-TRP-LEU-HIS-ADE plotny. Tyto plotny byly zabaleny do plastového sáčku a kultivováno při 30 °C 2-3 dny.

2.5.3. Testování interakcí proti cDNA knihovně

Kvasinkové buňky s „návnadou“ byly inokulovány do 2.5 ml média SD-TRP a kultivována 8 h na třepačce při 30°C. Poté byla narostlá kultura inokulována do 50 ml média SD-TRP a

kultivována přes noc na třepačce při 30°C. Následně byl z kultury odebrán 1 ml, který byl 5 min centrifugován při 2500 rcf a pelet resuspendován v 1 ml ddH₂O. Na spektrofotometru byla změřena jeho OD₅₄₆. Objem odpovídající 30 OD₅₄₆ byl rozdělen do 50 ml falkonek a centrifugován 5 min při 700 rcf. Pelet byl resuspendován v 200 ml 2x YPAD (ohřátého na 30 °C) a z něj odebrán 1 ml. Tento vzorek byl centrifugován 5 min při 2500 rcf, byl z něj odpipetován supernatant a pelet resuspendován v ddH₂O. Opět byla změřena jeho OD₅₄₆. Kvasinkové buňky s plazmidem byly kultivovány tak dlouho, dokud se jejich OD₅₄₆ nezčtyřnásobila. Kvasinková kultura byla rozdělena do čtyř 50 ml falkonek, které byly centrifugovány 5 min při 700 rcf. Pelety byly resuspendovány v 30 ml ddH₂O vortexováním a opět centrifugovány 5 min při 700 rcf. Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován v 1 ml LiOAc/TE (1M LiOAc, 10x TE pH 7.5, dH₂O) a přenesen do 1.5ml mikrozkušavky. Vzorky byly centrifugovány 5 min při 700 rcf, poté byl supernatant odstraněn a pelet resuspendován v 520 µl LiOAc/TE. Dále byly připraveny 4 falkonky, do kterých bylo přidáno 25 µl cDNA plazmidové knihovny, 100 µl 2x denaturované nosičové DNA, 520 µl kvasinkových buněk a 2.5 ml PEG/LiOAc (1 M LiOAc, 10x TE pH 7.5, 50 % PEG). Vzorky byly vortexovány 1 min. Následně byly inkubovány 45 min při 30 °C a každých 15 min krátce vortexovány. Do všech vzorků bylo napipetováno 160 µl DMSO a zkumavky okamžitě protřepány. Vzorky byly inkubovány 20 min při 42 °C a co 5 min protřepávány. Po inkubaci proběhla centrifugace 5 min při 700 rcf. Supernatant byl dekantován a pelet resuspendován ve 3 ml média 2x YPAD. Všechny vzorky byly sloučeny do jedné falkonky, která byla 90 min inkubována při 30 °C a stálém třepání. Buňky byly následně centrifugovány 5 min při 700 rcf a pelet resuspendován v 4.5 ml 0.9 % NaCl. Z falkonky byl odebrán vzorek 10 µl, který byl následně zředěn v poměru 1:500, 1:5000 a 1:50 000. Tyto vzorky byly následně vysety na SD-TRP-LEU plotny, které byly využity pro zjištění efektivnosti transformace. Zbytek suspenze byl vyset na SD-TRP-LEU-HIS-ADE plotny, které byly umístěny do plastových sáčků a inkubovány 3-4 dny při 30°C.

2.6. Mikroskopování

Fluorescence vektoru AtTYN1 s N-terminální fúzí GFP pod ubikvitinovým promotorem, který byl použit při transientní transformaci listu *Nicotiana benthamiana*, byl sledován

fluorescenčním mikroskopem Olympus BX51 s kamerou ALTA U4000 (Apogee Imaging Systems, Inc.). Při zvětšení 60x byla použita vodní imerze.

Fluorescenční signál vektoru 35S::GFP:AtTYN2, kterým byla stabilně transformována rostlina *Arabidopsis thaliana*, byl sledován invertovaným skenovacím konfokálním fluorescenčním mikroskopem Zeiss LSM 880, s objektivem C-Apochromat 40x/1.2.

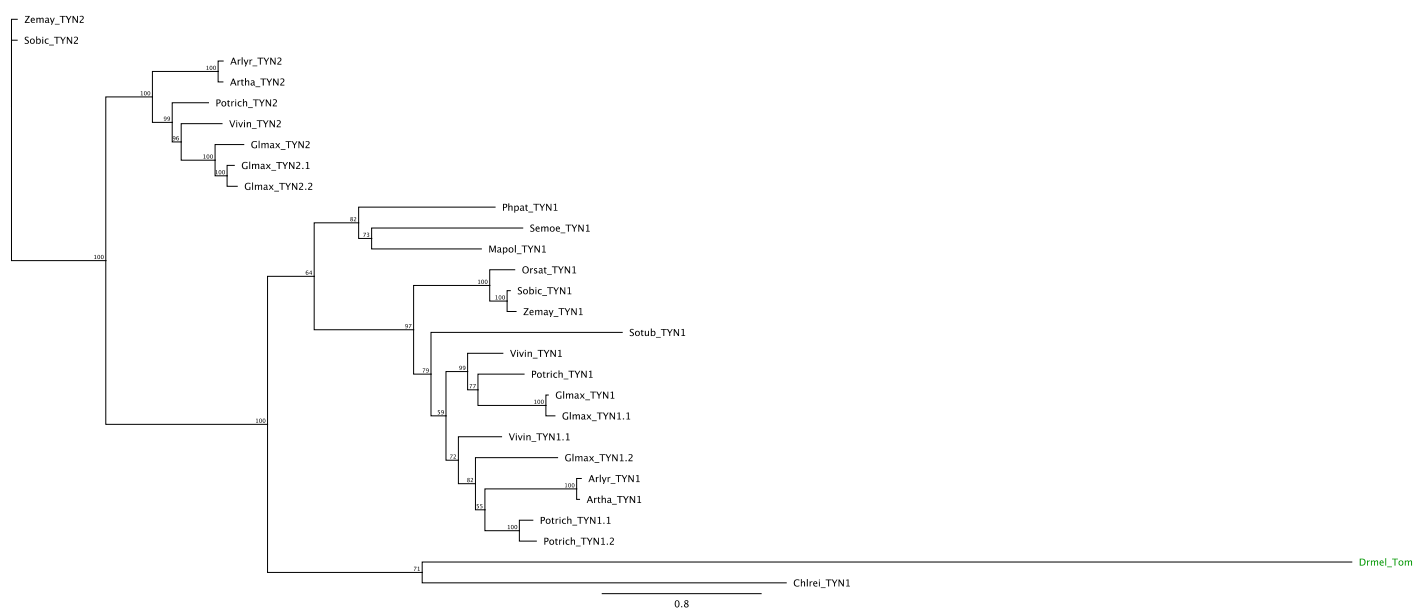
3. Výsledky

3.1. Fylogenetika

Základní fylogenetická analýza rostlinného tomosynu zahrnovala 13 druhů rostlin, konkrétně *Arabidopsis lyrata* (Arlyr), *Arabidopsis thaliana* (Atha), *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlrei), *Glycine max* (Glmax), *Marchantia polymorpha* (Mapol), *Oryza sativa* (Orsat), *Physcomitrella patens* (Phpat), *Populus trichocarpa* (Potrich), *Selaginella moellendorffii* (Semoe), *Solanum tuberosum* (Sotub), *Sorghum bicolor* (Sobic), *Vitis vinifera* (Vivin) a *Zea mays* (Zemay). Jako outgroup byl použit gen NP_572819.4 (isoforma J tomosynu *D. Melanogaster*).

Proteinové sekvence byly získány nástrojem BLAST na stránce phytozome.jgi.doe.gov. Pokud se se výsledcích objevovalo více alternativních sestřihů, byla vybrána nejdelší sekvence. V programu Geneious Prime byly sekvence alignovány pomocí ClustalW 2.1. Funkcí Mask Alignment byly ze všech sekvencí vymazány mezery. Takto vznikl alignment bez mezer o 599 aminokyselinových zbytcích. Následující fylogenetická analýza byla provedena také v programu Geneious metodou maximum-likelihood pomocí pluginu PhyML (Guindon et al., 2010).

Fylogenetická analýza odhalila konzervaci tomosynu napříč rostlinnými třídami. Výsledný fylogenetický strom znázorňuje, že se tomosyny po přechodu rostlin na souš rozdělily do dvou klastrů, přičemž v klastru v homologem AtTYN2 se nenachází žádný zástupce výtrusných rostlin. Naopak u zelených řas byl nalezen pouze jeden zástupce. Samostatně také klastrují zástupci jednoděložných a dvouděložných rostlin. V případě rýže se nám nepodařilo získat sekvenci homologu AtTYN2 z databáze, přestože je anotovaná. Její nepřítomnost ve fylogenetickém stromu není tedy způsobena její druhotnou ztrátou. Fylogenetický strom také ukazuje velikou evoluční vzdálenost rostlinných tomosynů od ostatních říší reprezentovaných v naší analýze zástupcem z *D. melanogaster*. To ukazuje na vysokou funkční specializaci rostlinných a živočišných tomosynů spojenou pravděpodobně s jinými funkcemi v buněčném kontextu a také s rozdílným spektrem interaktorů.



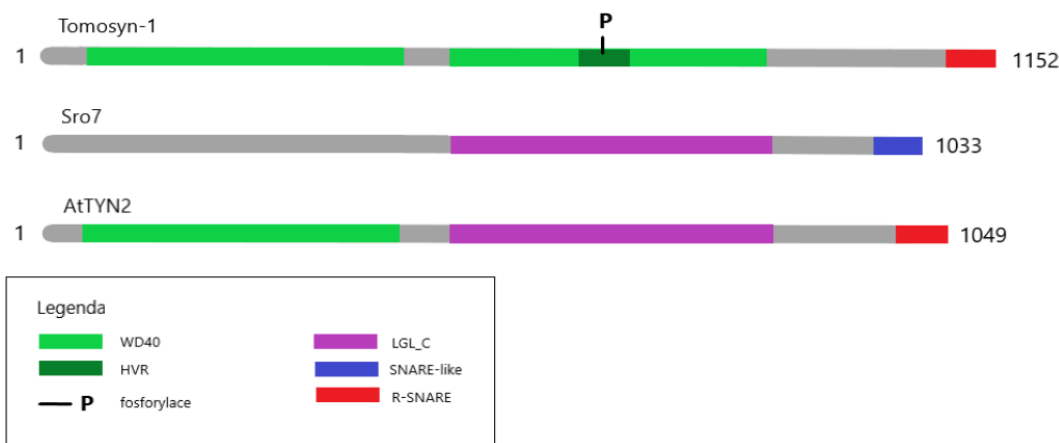
Obr. 6: Fylogenetická analýza rostlinných tomosynů. Strom byl konstruován metodou maximum – likelihood v programu Geneious Prime. Jako outgroup byl použit živočišný tomosyn *D. melanogaster* (Drmel_Tom). Hodnota bootstrapu byla stanovena na 100 opakování. Měřítko větví je uvedeno pod stromem.

3.2. Základní charakteristika AtTYN1, AtTYN2 a jejich exprese

Genom *Arabidopsis thaliana* obsahuje 2 geny tomosynů, přičemž každý gen představuje jednu sestříhovou variantu. Oba geny jsou téměř stejně dlouhé, zajímavostí však je, že složením aminokyselin jsou si podobné jen ze 44 %. Dalším rozdílem je také výskyt na chromozomu. AtTYN1 se nachází na chromozomu 5, kdežto AtTYN2 sídlí na chromozomu 4. Pomocí nástroje Conserved Domain Search dostupného na NCBI byly vyhledány a porovnány konzervované domény tomosynu rostlin, živočichů a kvasinek. Ve struktuře Sro7, kvasinkovém homologu tomosynu, se na C-terminální části proteinu vyskytuje LGL doména, naopak v živočišném tomosynu se nachází rozsáhlé WD40 domény. Rostlinný tomosyn je zajímavý tím, že se na jeho N-terminální části vyskytuje WD40 doména a ve své C-terminální doméně má konzervovanou LGL doménu, typickou pro Sro7.

	Gen		Protein		
	Chromozom	Délka [pb]	Délka [AA]	Molekulární hmotnost	Izoelektrický bod
AtTYN1	5	3776	1124	122658.8	5.54
AtTYN1.1	5	3786	1099	120061.7	5.48
AtTYN2	4	3558	1049	116358.4	7.35
AtTYN2.1	4	3579	1050	116486.6	7.35

Tabulka 5: Základní charakteristika obou tomosynů a jejich sestříhových variant

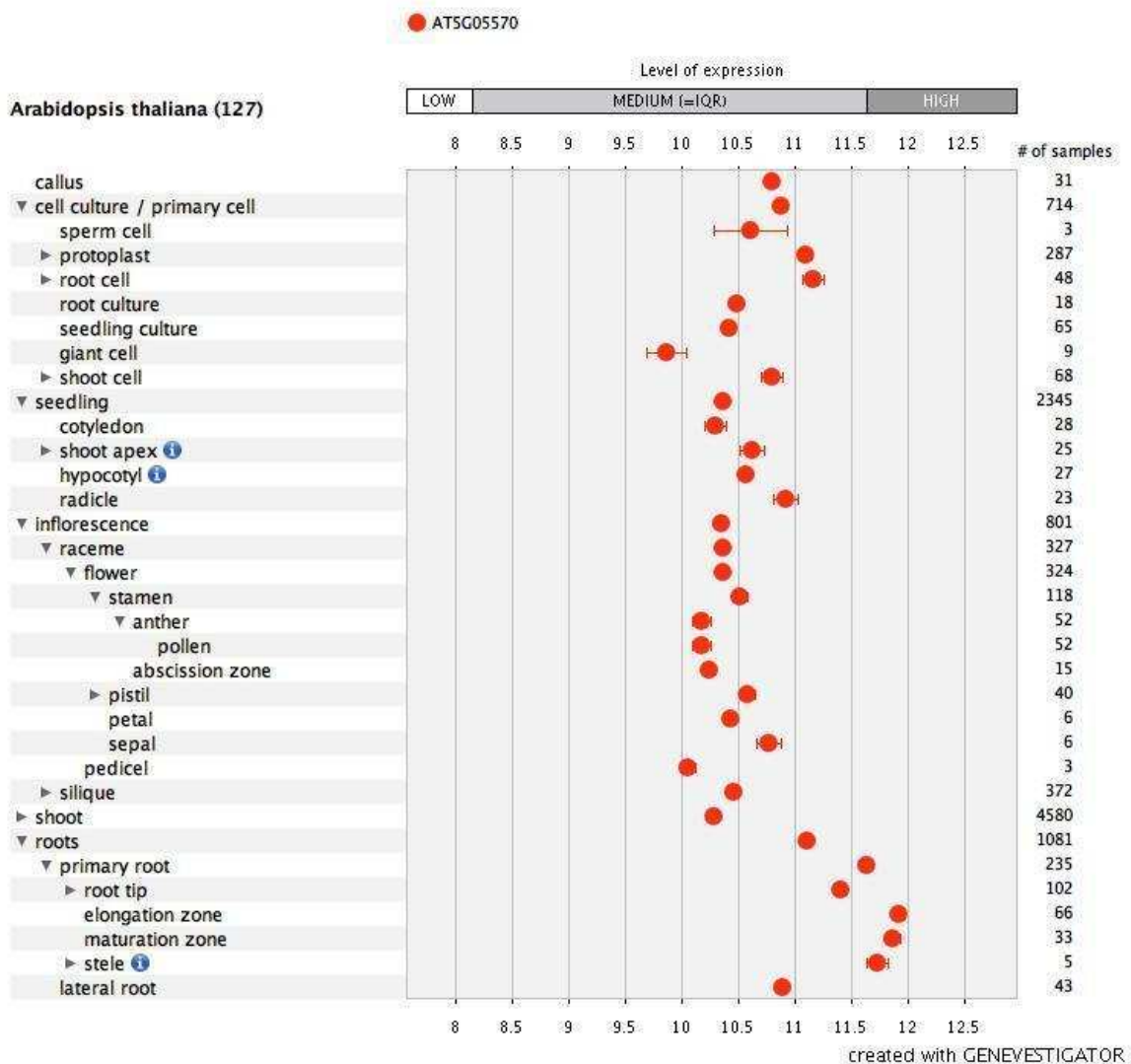


Obr. 6: Konzervované domény v živočišném tomosynu (Tomosyn-1), jeho kvasinkovém homologue (Sro7) a rostlinném homologue (AtTYN2). Lidský protein STXBP5 posloužil jako zástupce živočišného tomosynu, ve své struktuře obsahuje WD40 domény (světle zeleně), HVR doménu obsahující fosforylační místo (tmavě zeleně) a R-SNARE (červeně). Sro7 obsahuje ve své C-terminální části LGL doménu (fialově) a SNARE-like doménu (tmavě modře). Jako zástupce rostlinného tomosynu byl vybrán tomosyn-2 z *Arabidopsis thaliana*, který má v N-terminální části proteinu WD40 doménu (světle zeleně) a v C-terminální obsahuje LGL (fialově) a R-SNARE doménu (červeně). Upraveno podle (Ashery et al. 2009).

Programem Genevestigator (Hruz et al., 2008) bylo zjištěno, že se oba rostlinné tomosyny v téměř stejné míře exprimují ve všech tkáních. Lehce zvýšená exprese AtTYN1 byla

zaznamenána v kořenech (zejména v kořenové špičce, elongační a maturační zóně). V dalších tkáních si však rostlinný tomosyn-1 udržuje stejnou hladinu exprese. Podobně na tom je také AtTYN2. Jeho zvýšená exprese se vyskytuje v pylu, ale také ve stélé a spermatických buňkách. Exprese v posledních dvou zmiňovaných tkáních byla však pozorována v malém množství vzorků. Vliv prostředí také indikuje změnu exprese, konkrétně u tomosynu-2. Zatímco AtTYN1 je konstitutivní gen, jehož exprese není nijak výrazně ovlivněna, exprese AtTYN2 se výrazně zvyšuje při působení hlavně osmotického stresu.

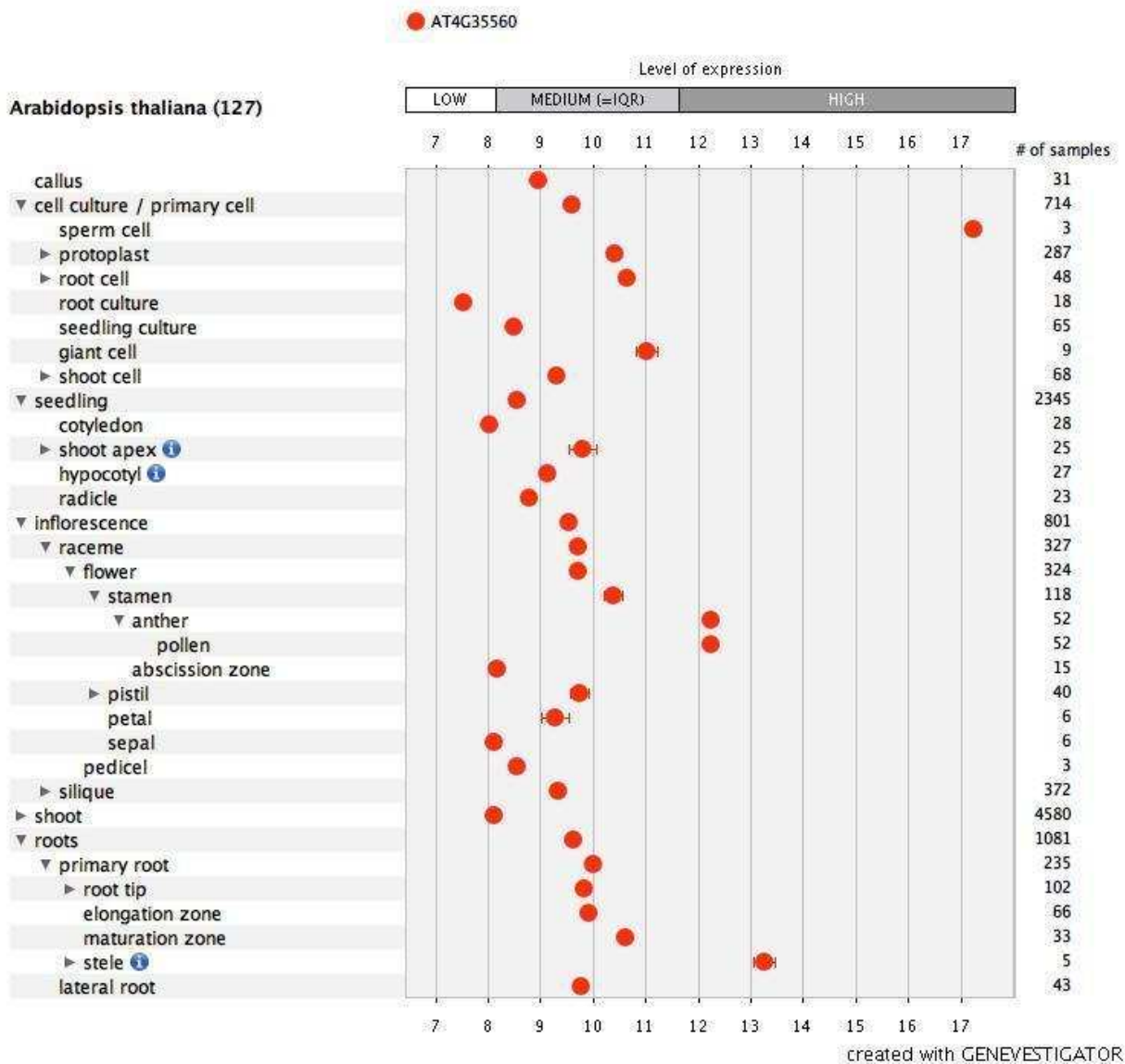
Dataset: 127 anatomical parts from data selection: AT_AFFY_ATH1-0
Showing 1 measure(s) of 1 gene(s) on selection: AtTYN1



Obr. 7: Expresa AtTYN1 v různých rostlinných pletivech. Největší míra exprese zaznamenána v kořenech rostlin i v protoplastech z nich izolovaných. Vytvořeno v Genevestigatoru.

Dataset: 127 anatomical parts from data selection: AT_AFFY_ATH1-0

Showing 1 measure(s) of 1 gene(s) on selection: AtTYN2



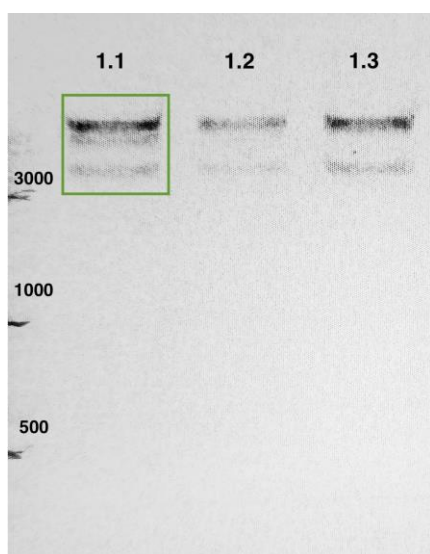
Obr. 8: Expres AtTYN2 v různých rostlinných pletivech je poměrně stabilní, vyšší míru exprese lze zaznamenat v pylu, spermatických buňkách a stéle. Vytvořeno v Genevestigatoru.

3.3. Exprese a klonování

Pro amplifikaci tomosynů pomocí PCR nebo jejich sekvenaci bylo nutné navrhnout vhodné primery, které nasedají na začátek a konec kódující sekvence tomosynů. Primery byly navrhovány pomocí nástroje Primer-BLAST od NCBI nebo programu Geneious. V případě primerů použitých při amplifikaci DNA se jejich délka pohybovala od 29 do 33 nt, zatímco délka sekvenačních primerů byla kratší a čítala 22 nt. Teplota tání dvouřetězce primer-templát (T_m), teplota annealingu (T_a) a obsah G a C bází byla testována prostřednictvím nástroje T_m Calculator od NEB. V případě nutné optimalizace teploty byly na 5' konce primerů přidávány sekvence thyminů.

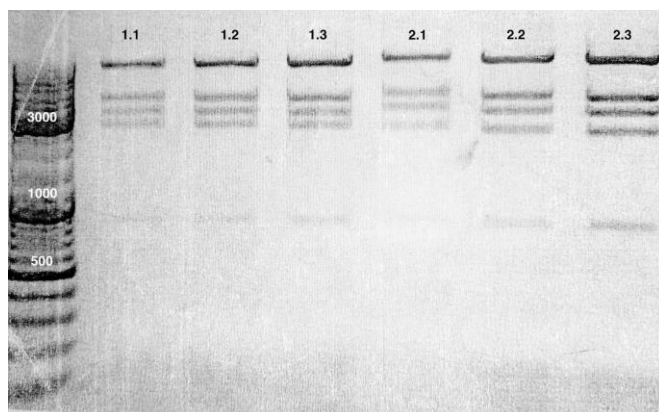
3.3.1. Klonování AtTYN1

Amplifikace AtTYN1 probíhala za použití předního primeru AtTYN1 Fw Kpn a zadního primeru AtTYN1 Rv Sal, jako templát posloužila cDNA. Teplota nasedání primerů byla nastavena na 59 °C, 64 °C a 68 °C, neoptimálnější T_a bylo 68 °C. Výsledkem byl 3300 pb velký produkt na elektroforetickém gelu, který byl izolován a reamplifikován pomocí PCR. Takto připravená DNA s tupými konci byla zaligována do linearizovaného vektoru pJET1.2 a natransformována do bakterií *E. coli* kmene TOP10. Správnost transformace byla ověřena kontrolní restrikcí enzymem BglII. Výsledek restrikčního štěpení odpovídal předpokladu, a proto byl AtTYN1 ověřen sekvenací. Obdržené výsledky však nebyly dostačující, protože osekvenované úseky byly příliš krátké. Další pokus o sekvenaci byl odložen. Restrikčním štěpením enzymy KpnI a XhoI byl připraven Gateway vektor pENTR3C, do kterého byl ligační reakcí vložen AtTYN1. Kontrolní štěpení enzymy BamHI a EcoRV poukazovalo na správné zaklonování tomosynu-1 do vektoru. Na sekvenaci byl odeslán AtTYN1 ve vektoru pENTR3C. Sekvence tentokrát proběhla správně a její výsledky mimo jiné ukazují, že byla amplifikována kratší izoforma tomosynu-1. Další krokem bylo vložit vektor pENTR3C-TYN1 LR reakcí do destinačního vektoru pGWB6, což se pak podařilo až po sérii neúspěšných pokusů. Vzniklý pGWB6-TYN1 by kontrolně štěpen restrikťázami NotI a EcoRI, přičemž ze 3 testovaných kolonií nesla zmíněný vektor pouze jedna z nich. Izolovaná DNA z této kolonie byla uschována do -20 °C, bohužel z časových důvodů nebylo s tímto plazmidem pracováno dále.



Obr. 9: Restrikce pGWB6-AtTYN1 enzymy NotI a EcoRI. Předpokládané úseky měly být dlouhé 9031, 7390 a 3410 pb. Správně štěpený vzorek je označen rámečkem.

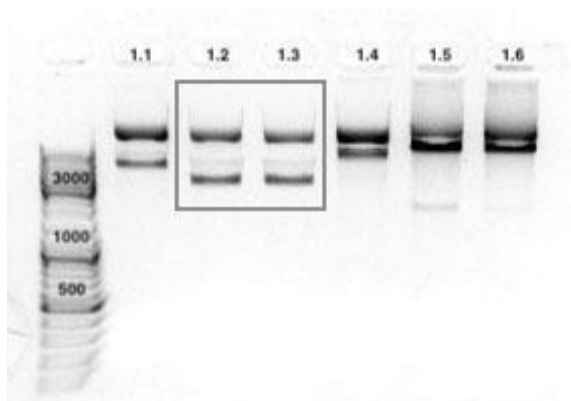
Za použití primerů AtTYN1 seq5 fw Kpn, AtTYN1 Rv Sal a templátu pENTR3C-TYN1 byla amplifikována ~ 600 bp dlouhá C-terminální doména tomosynu-1. Po ověření výsledku amplifikace na elektroforetickém gelu byla C-doména AtTYN1 zaligována do vektoru pENTR3C a vložena do bakterií *E. coli* kmene DH5 α . Kontrolní restrikce enzymy BamHI a EcoRV dokázala správné zaklonování tomosynu-1. Posledním krokem bylo vložení AtTYN1 do destinačního vektoru pGWB6 LR reakcí a transformace bakterií *E. coli* kmene DH5 α . Restrikce vektoru enzymy BamHI a BglII indikovala správné zaklonování C-terminální domény do vektoru pGWB6, proto byl plazmid uschován do -20°C.



Obr. 10: Restrikce C-terminálních domén AtTYN1 (1.1-1.3) a AtTYN2 (2.1-2.3) zaklonovaných do vektoru pGWB6. Oba plazmidy štěpily restrikční enzymy BamHI a BglII. Štěpením pGWB6-AtTYN1C měly vzniknout sekvence dlouhé 7958, 3481, 2674, 2224 a 778 pb. Štěpením pGWB6-AtTYN2 měly vzniknout podobné sekvence, konkrétně 7958, 3481, 2674, 2069 a 778 pb.

Tomosyn-1 byl také LR reakcí vložen do destinačního vektoru pUBN-GFP-DEST, přičemž jako vstupní vektor byl využit pENTR3C-TYN1. Ligační reakce byla natransformována do *E. coli* DH5 α a vyseta na kultivační plotny se spektinomycinem. Na plotnách narostlo celkem 6 kolonií. Všechny kolonie byly inokulovány do MPB média s přidavkem spektinomycinu a na druhý den byla z narostlé kultury izolována DNA a ověřena

restriktázami EcoRI. Enzym naštěpil DNA do předpokládaných úseků a vytvořený plazmid byl uschován do -20 °C pro další práci.



Obr.11: Restrikce pUBN-GFP-AtTYN1. Štěpením plazmidu enzymem EcoRI měly vzniknout sekvence dlouhé 9575 a 3799 pb. Předpokládané úseky tvořily vzorky 1.2 a 1.3 označené rámečkem.

Pro potřeby Y2H byl tomosyn-1 zaklonován i do vektoru pLexA-N. Nejdříve však byl vektor pLexA-N štěpen restriktázami KpnI a SalI, aby do něj mohl být ligací vložen AtTYN1. Ligační reakcí byly natransformovány bakterie *E. coli* kmene TOP10, které byly vysety na kanamycinové plotny. Druhý den byl na plotnách zaznamenán růst malých a velkých kolonií, proto byly oba druhy kolonií inokulovány do MPB média s přidavkem kanamycinu. Z bakterií byla izolována DNA, která byla ověřena kontrolní restrikcí restriktázami KpnI a SalI. Štěpením DNA bylo zjištěno, že požadovaný plazmid nesly malé kolonie. Vektor pLexA-N se zaklonovaným tomosynem-1 byl následně uložen do -20°C.

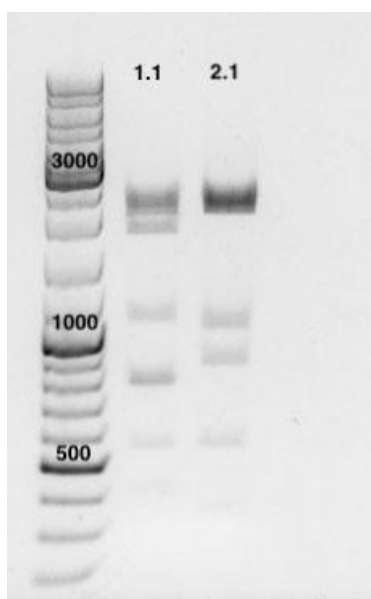
3.3.2. Klonování AtTYN2

Stejným postupem při PCR, jen s použitím primerů AtTYN2 Fw Kpn a AtTYN2 Rv Sal, měl být získán AtTYN2, což se však nedařilo. Vyzkoušeno bylo jak použití různé koncentrace cDNA, tak enhanceru, který pomáhá při odstraňování vlásenek a navázání primerů na templátovou DNA. Kontrolní restrikce vzniklých produktů nevykazovaly přítomnost požadované sekvence, proto byl vytvořen a objednan nový zadní primer Atyn2_Rv1_Sal a jako templát posloužil poskytnutý vektor pGEM-T se zaklonovaným AtTYN2 (naklonoval Michal Hála, nepublikováno). PCR produkt byl pomocí kitu purifikován a pro vytvoření kohezních konců štěpen restriktázami KpnI a SalI. Do vektoru pENTR3C, štěpeného restriktázami KpnI a XhoI, byl ligací vložen purifikovaný

AtTYN2. Vzniklou ligační reakcí byly transformovány kompetentní buňky *E. coli* kmene DH5 α , které byly vysety na kanamycinové plotny. DNA z narostlé kultury byla izolovaná pomocí kitu a pro zvýšení koncentrace byla eluována přes 3 kolonky jedním objemem elučního pufru. Následná sekvenace se však nezdařila a kvůli podezření na příliš vysokou koncentraci DNA bylo doporučeno ji snížit o 1/3, což zaznamenalo úspěch. Zasláné chromatogramy ukázaly, že amplifikovaná DNA obsahuje 85 pb dlouhý intron. Ten bylo nutné odstranit, protože tomosyn-2 měl být vložen do pLexA-N a exprimován v kvasinkách. Byly proto navrženy a objednány primery fw_tyn2_int2 a rv_tyn2_int2, obsahující překrývající se úseky ze sousedních exonů, přilehlých k odstraňovanému intronu, které byly použity při PCR. Výsledkem byly fragmenty kódující sekvence před a za intronem s překryvy, které byly využity jako templát k dosyntetizování plné délky kódující sekvence v následné PCR. Produkt byl zkontrolován na elektroforetickém gelu, ligací vložen do linearizovaného vektoru pJET a znovu odeslán do laboratoře na sekvenaci. Obdržené výsledky potvrdily nepřítomnost intronu. Další postup probíhal jako u AtTYN1, sekvence tomosynu-2 byla přes pENTR3C vložena do pGWB6. Izolovaná DNA z kolonií byla kontrolně štěpěna enzymy EcoRI a NotI a uschována do -20°C.

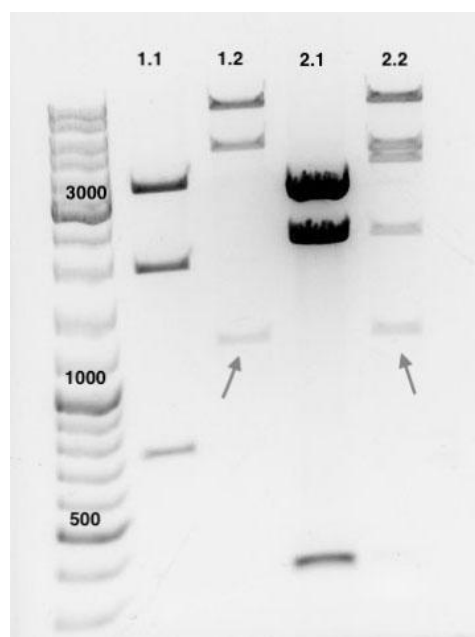
Také C-terminální doména tomosynu-2 byla, za použití primerů AtTYN seq4 Kpn a Atyn2_Rv1_sal, amplifikována polymerázovou řetězovou reakcí. Teplota annealingu byla 72°C. Cca 860 pb velký produkt byl pomocí kitu purifikován a štěpen restriktázami KpnI a SalI a vektor pENTR3C, do něhož měla být C-doména AtTYN2 vložena, byl štěpen enzymy KpnI a XhoI. Následovala společná ligační reakce, kterou byly transformovány buňky *E. coli* kmene DH5 α . Transformované buňky byly vysety na kamamycinové plotny, z narostlých bakterií byla izolována DNA, která byla kontrolně štěpěna enzymy EcoRI a BamHI do předpokládaných úseků. Vytvořený vektor byl uschován do -20 °C, z časových důvodů nebylo možno pracovat se zaklonovanými C-terminálními doménami dále.

Vektor p-LexA-N se zaklonovaným tomosynem-2 se připravoval stejným způsobem jako pLexA-N-TYN1. Z vektoru pJET byl AtTYN2 vyštěpen a zaligován do pLexA-N, DNA z narostlé kultury byla kontrolně štěpěna enzymy KpnI a SalI a uschována do -20 °C pro transformaci kvasinek a následný Y2H.



Obr. 12: Restrikce pLexA-N-AtTYN1 (1.1) a pLexA-N-AtTYN2 (2.1) restriktázami *Hin*III a *Xho*I. V případě AtTYN1 byl očekávaný vznik úseků o 2054, 1966, 1726, 1110, 744, 520 a 375. AtTYN2 měl vytvořit úseky o 1966, 1726, 1100, 816 a 340. Oba dva proteiny vytvořily očekávané sekvence.

Obr. 13: Restrikce pENTR3C-AtTYN1 (1.1), pGWB6-AtTYN1 (1.2), pENTR3C-AtTYN2 (2.1) a pGWB6-AtTYN2 (2.2). Vektor pENTR3C-AtTYN1 měl vytvořit úseky o 3228, 1832 a 709 pb, pGWB6-AtTYN1 se měl štěpit na sekvence dlouhé 7958, 5092, 4248, 1832 a 709 pb, AtTYN2 v pENTR3C měl vytvářet 3038, 2088 a 320 pb dlouhé sekvence a AtTYN2 v PGWB6 se měl štěpit na 7258, 4902, 4248, 2088 a 320 dlouhé úseky. Šipky označují pravděpodobně nezaznamenané či nově vzniklé restrikční místo v pGWB6. Všechny testované plazmidy se štěpily správně s výjimkou pGWB6-AtTYN1.

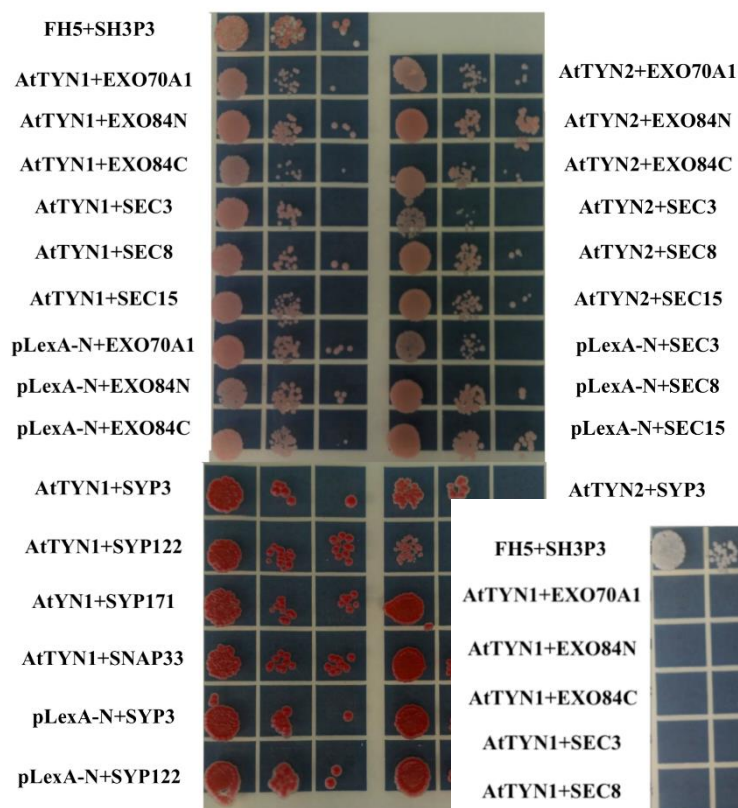


3.4. Dvouhybridní kvasinkový systém

Interakce tomosynů byly testovány pomocí dvouhybridního kvasinkového systému. Oba tomosyny byly kvůli udržení funkčnosti jejich C-terminální domény zaklonovány do vektoru

pLexA-N, ověřeny restrikcí a vloženy do kvasinek kmene NMY51. Tato primární transformace byla vyseta na plotny SD-TRP. Jako potenciální interaktory, zaklonovány ve vektoru pGAD, byli vybrány SYP3, SYP122, SYP171 a SNAP33, proteiny patřící do rodiny SNARE (poskytnuty Dr. Pečenkovou, ÚEB AVČR). Dále byly testovány podjednotky poutacího komplexu exocyst Exo70A1, C a N-terminální doména Exo84, Sec3, Sec8 a Sec15b (Hála et al., 2008; Fendrych et al., 2010). Sekundární transformace byla vyseta na dvouselekční plotny SD-TRP-LEU. Přítomnost interakce byla testována vysetím nařaděných kolonií na čtyřselekční plotnu SD-TRP-LEU-ADE-HIS, přičemž narostlé kolonie znamenají pozitivní interakci testovaných proteinů. Jako pozitivní kontrola sloužila interakce forminu5 a SH3P3 domény (Houšková 2015). Negativní kontrolou byl prázdný vektor pLexa-N. K otestování úspěšnosti transformace byly jednotlivé kolonie studovaných proteinů nařaděny a vysety na dvouselekční plotny SD-TRP-LEU, jejich růst indikoval úspěšnou transformaci. Růst kvasinek byl na kontrolních SD-TRP-LEU zaznamenán, nicméně žádná z testovaných interakcí se nepotvrdila. Růst pozitivní kontroly vylučuje možnost špatně připravených ploten.

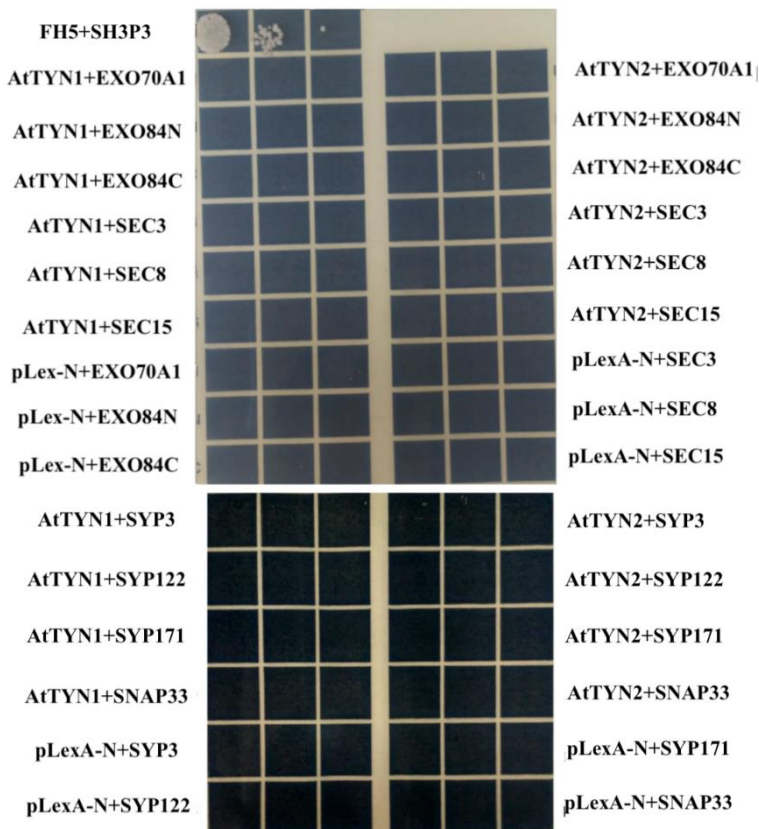
Kromě párových interakcí bylo také provedeno plošné testování interakcí pomocí komerční cDNA knihovny odvozené z květenství *A. thaliana* (*CD4-30*, *ABRC*). Ačkoli byl experiment opakován několikrát a účinnost transformace byla dobrá (cca 10 mil. nezávislých transformantů), přesto se nepodařilo nalézt ani jediný relevantní interaktor.



Obr.14: Testování interakcí AtTYN1 a AtTYN2 mezi vybranými podjednotkami exocystu a SNARE proteiny metodou Y2H. Růst kvasinek na kontrolním médiu SD-Trp-Leu

indikovala správnou transformaci.

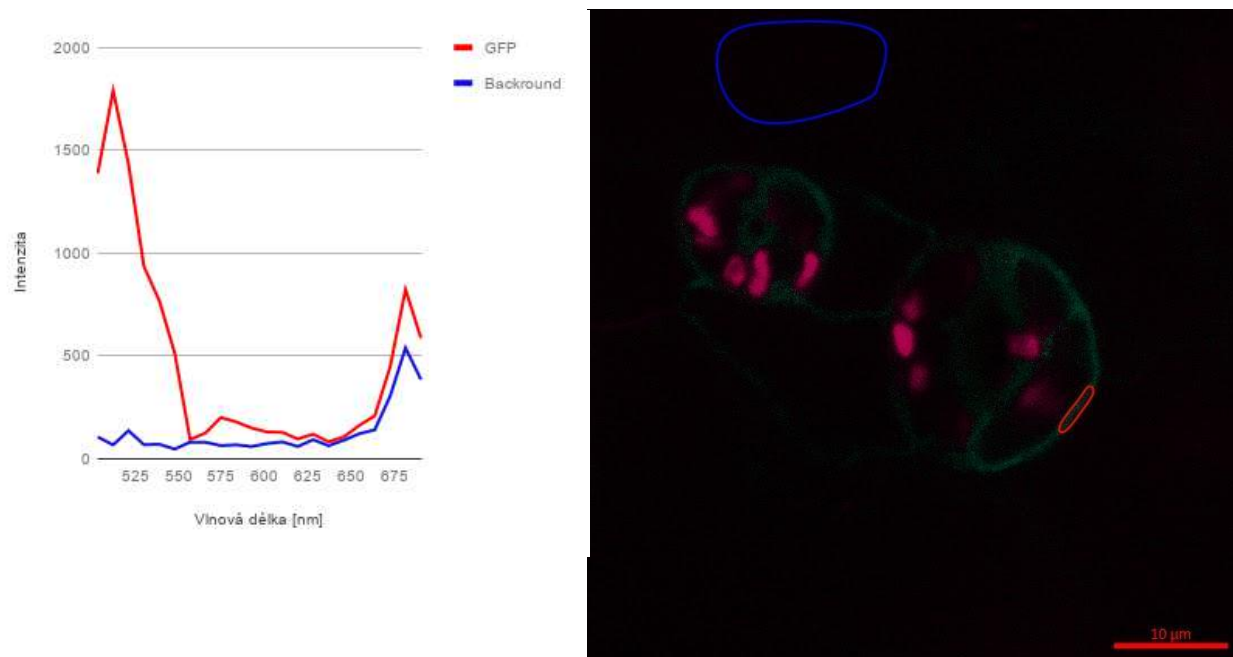
Obr. 15: Testování interakcí AtTYN1 a AtTYN2 s vybranými podjednotkami exocystu. Kromě pozitivní kontroly FH5+SH3P3 nebyl na čtyřselektivním médiu zaznamenán žádný růst kvasinek. Y2H nedetekoval žádnou interakci.



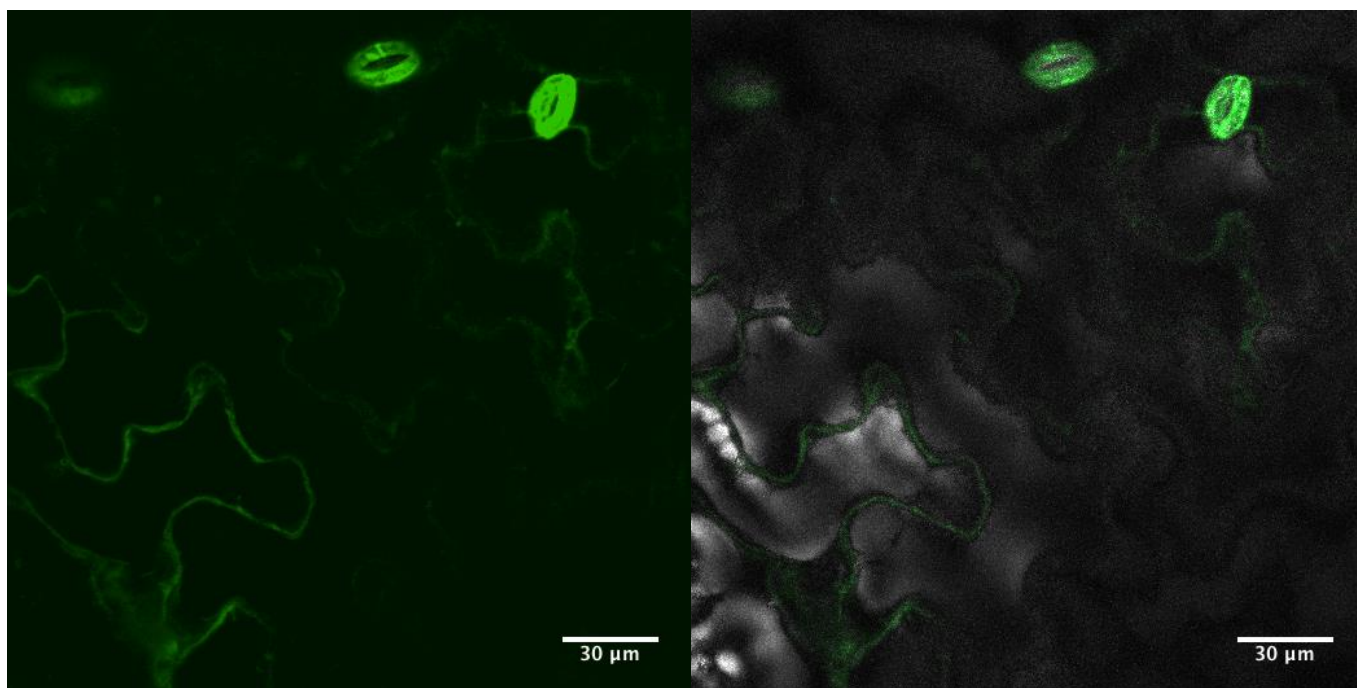
3.5. Lokalizace

Pro sledování buněčné lokalizace rostlinného tomosynu 2 byl použit vektor pGWB6-GFP-TYN2, který obsahoval tomosyn 2 s N-terminální GFP fúzí pod 35S promotorem. Tímto vektorem byla stabilně natransformována linie *Arabidopsis* typu Col-0. Její T1 generace semen byla sklizena, sterilizována a pěstována na horizontálních ½ MS plotnách s kanamycin-hygromycinovou selekcí (kanamycin - 45 µg/ml, hygromycin B - 80 µg/ml). Konfokálním mikroskopem byly pozorovány 10 denní, 14 denní a 29 denní rostliny. Pozována byla také lokalizace TYN2 u etiolovaných rostlin. Mikroskopováním bylo zjištěno, že se tomosyn 2 lokalizuje do cytoplasmy a nenachází se v jádře. Silnější signál byl pozorován ve vyvíjejících se a dospělých průduchových buňkách. Zdálo se, že se ve vyvinutých průduchových buňkách tomosyn 2 lokalizuje na membrány chloroplastů, nicméně toto tvrzení dalším mikroskopováním potvrzeno nebylo. Fluorescenční signál byl v etiolovaných rostlinách slabší, lokalizace však zůstala nezměněná.

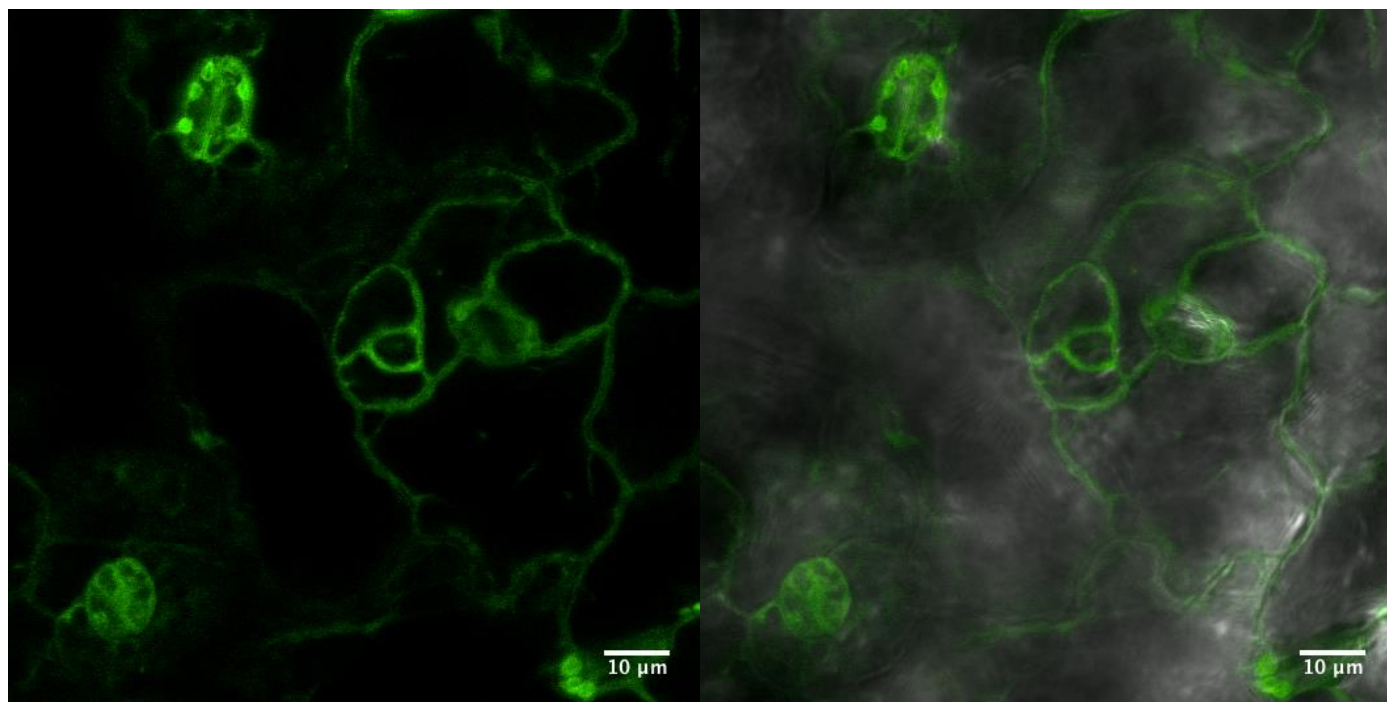
Specifita signálu byla testována pomocí metody Lambda Scan, která umožňuje sledovat emisní spektrum signálu v rámci určeného intervalu. Na obr. 16 je znázorněno emisní spektrum pozorovaného signálu a emisní spektrum pozadí. Z obrázku je patrné, že zelená čára znázorňující emisní spektrum pozorovaného signálu odpovídá emisnímu spektru GFP s maximem kolem 520 nm.



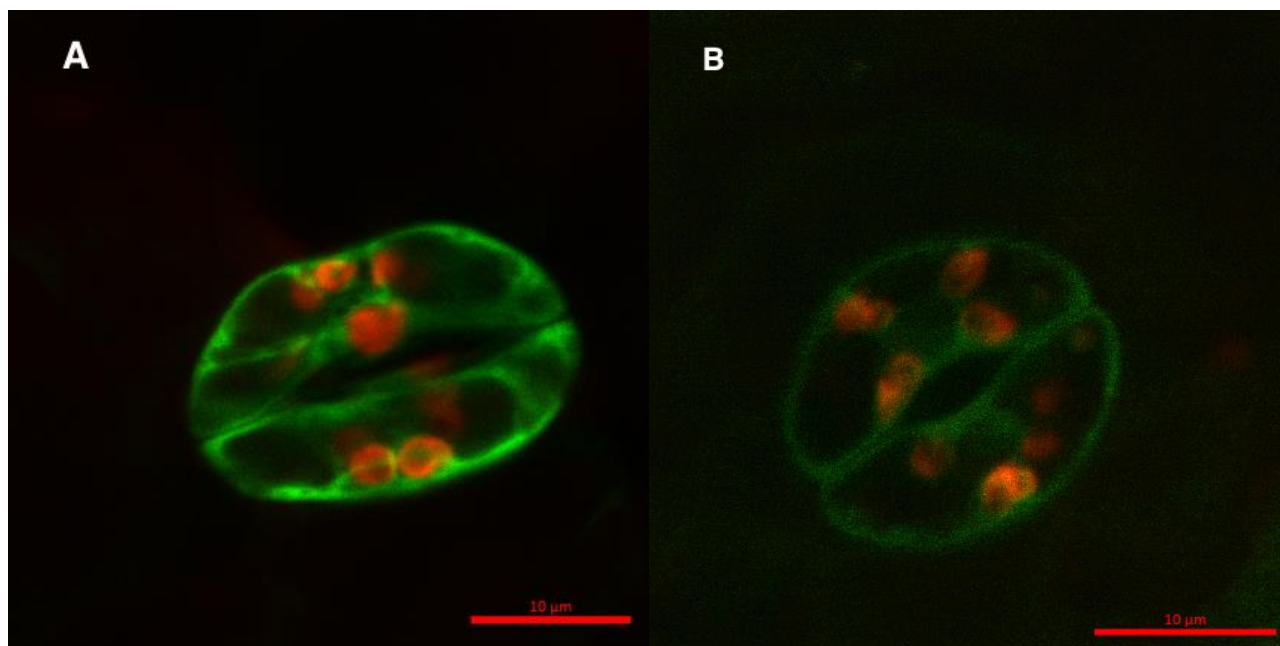
Obr. 16: Lambda scan 10 denní rostliny *Arabidopsis* exprimující 35S::GFP:AtTYN2. Graf vlevo zachycuje naměřenou intenzitu fluorescence při vlnových délkách od 500-700 nm. Červená křivka znázorňuje GFP, které exprimuje vzorek. Modrá křivka slouží jako kontrola.



Obr. 17: Buněčná lokalizace 35S::GFP:AtTYN2 v 14 dní staré *Arabidopsis thaliana*. Fluorescenční signál je slabý, nicméně je vidět, že AtTYN2 se lokalizuje v cytoplasmě. Silnější expresi lze zaznamenat v průduchových buňkách. Vlevo je GFP kanál a vpravo proložení GFP kanálu s viditelným světlem.



Obr. 18: Buněčná lokalizace 35S::GFP:AtTYN2 v 29 dní staré *Arabidopsis thaliana*. Fluorescenční signál je silnější ve zralých průduchových buňkách. Vlevo je GFP kanál a vpravo proložení GFP kanálu s viditelným světlem



Obr.19: Lokalizace 35S::GFP:AtTYN2 v průduchu 10 denní rostliny *Arabidopsis* kultivované na ½ MS plotnách za standardních podmínek (A) a ve tmě (B), červeně jsou znázorněny chloroplasty. V etiolovaném průduchu byl zaznamenán slabší signál GFP, lokalizace tomosynu-2 se nezměnila.

Kromě stabilní transformace *Arabidopsis* byla provedena také transientní transformace listu tabáku. Do listu *Nicotiana benthamiana* byl vložen TYN1 s N-terminální GFP fúzí pod ubivitinovým promotorem a po dvou dnech pozorován fluorescenčním mikroskopem. Bohužel nebyl zaznamenán žádný GFP signál, a to ani po dalších čtyřech dnech od transformace.

4. Diskuze

Tato práce měla za cíl studovat specifickou skupinu rostlinných proteinů zapojených s největší pravděpodobností v regulaci splývání sekretorických vezikulů s plazmatickou membránou. Jde o klíčový krok v procesu morfogeneze rostlinné buňky, její reakce na změnu složení okolního prostředí a v procesu interakce s okolními buňkami v rámci mnohobuněčného rostlinného těla případně interakce s okolní biosférou. Z těchto důvodů je důležité pochopit funkci tomosynů v rostlinné buňce.

4.1. Anotace rostlinných tomosynů

Ačkoli námi studované proteiny byly zařazeny mezi tomosyny již v prvních pracích zabývajících se fylogenetikou SNARE proteinů u rostlin (Pratelli et al, 2004), ve veřejných databázích (NCBI) jsou anotovány jako proteiny obsahující transducin/WD-40 doménu. Transducin je heterotrimerický G-protein sloužící jako součást fotoreceptorů a jako takový je exprimován hlavně v retinálních útvarech obratlovců. První zástupci této rodiny byly charakterizovány na počátku 80.let 20. století (Fung, 1983). Ukázalo se, že tyto proteiny obsahují doménu charakterizovanou přítomností aminokyselin tryptofanu a kyseliny asparagové. Tato doména byla pojmenována WD-40, podle své charakteristické délky a přítomnosti zmíněných aminokyselin. Další studie ukázaly, že jde o doménu, která v eukaryotických proteinech patří mezi deset nejrozšířenějších domén. Proteiny obsahující WD-40 doménu, často v mnoha opakováních, se i u rostlin účastní procesů spojených s buněčným dělením, regulací dynamiky cytoskeletu, genovou expresí, regulací nástupu kvetení a dlších procesů, kde je důležitá protein-proteinová interakce (Stirnemann et al, 2010). Přítomnost WD-40 domény v sekvenci tomosynů tak svádí k anotaci mezi proteiny podobné transducinu. Tak na byl například pod názvem DAW1 nalezen protein AtTYN2 (Borg et al., 2011). Šlo o experiment, v němž byly hledány cíle pro transkripční faktor DUO1, který je esenciální pro vývoj a funkci spermatických buněk pylu. Bylo nalezeno několik genů, jejichž exprese je zvyšována po vazbě DUO1, mezi nimi i gen pro AtTYN2. Toto pozorování velmi dobře koresponduje se zvýšenou hladinou exprese AtTYN2 ve

spermatických buňkách podle Genevestigatoru. Na druhou stranu anotace tomosynů podle jejich WD-40 domény vnáší do literatury zmatek a ztěžuje orientaci v problematice.

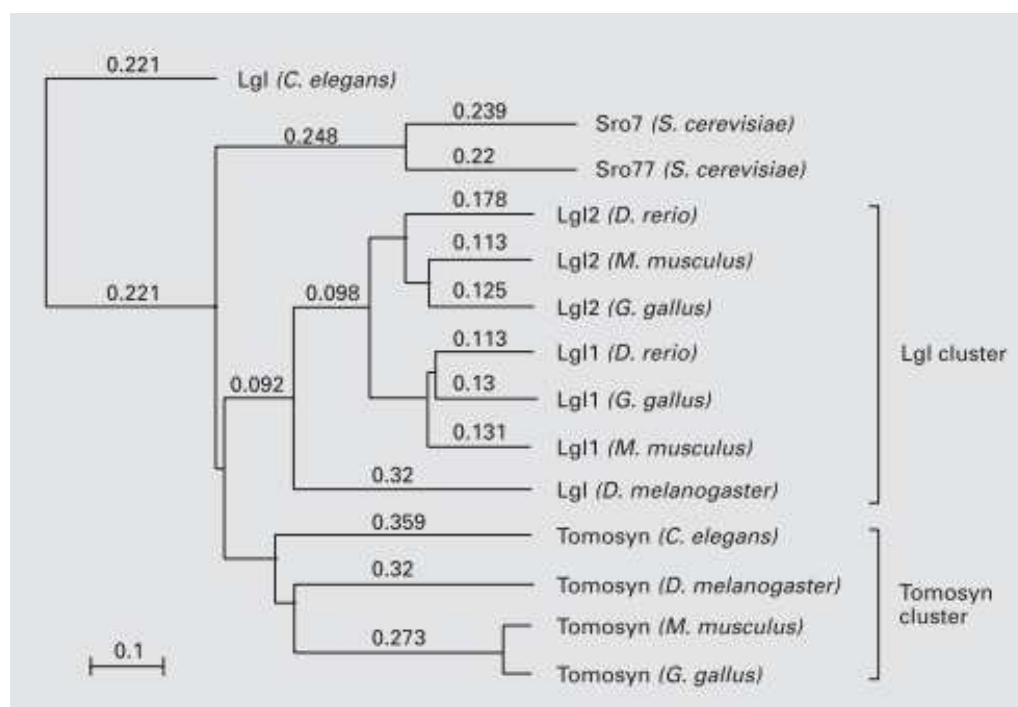
4.2. LGL a tomosyny, rozdělení u živočichů, kvasinek a rostlin

Rodina Lgl proteinů je v eukaryotech vysoce konzervovaná a kromě tomosynu obsahuje také lgl proteiny. Oba proteiny mají podobnou N-terminální doménu, která se skládá z několika WD40 domén vytvářejících β -vrtulovou strukturu. Kromě toho oba obsahují ve své struktuře také lgl doménu. Liší se však svou C-terminální doménou, kdy má tomosyn na svém konci R-SNARE a koncovou doménu, zatímco lgl protein ani jednu ze zmíněných domén neobsahuje. Živočišný genom zpravidla kóduje dva homology lgl proteinů (Lgl1 a Lgl2) a dva homology tomosynů (tomosyn-1 a tomosyn-2) (Vasioukhin, 2006). Naopak rostliny ve svém genomu neobsahují lgl proteiny, ale kódují zpravidla dva homology tomosynů. Zvláštním případem jsou houby, konkrétně podkmen *Saccharomycotina*, u nichž byly popsány homology tomosynu Sro7/77. Často jsou však Sro7/Sro77 zaměňovány s lgl proteiny, a to z důvodu absence R-SNARE domény na jejich C-terminálním konci. Lgl vznikly odvozením z tomosynu a v průběhu evoluce svou R-SNARE doménu ztratily (Kloepper et al., 2008; Kienle et al., 2009). Fylogenetická analýza navíc odhalila, že se Sro7/77 neklastuje do skupiny lgl proteinů, ani do skupiny tomosynů (Vasioukhin, 2006). Funkční provázanost proteinů obou rodin dokazuje také genetická komplementace. Buňky nesoucí dvojitou mutaci *sro7/sro77* vykazují přecitlivělost na akumulaci iontů Na^+ , zároveň je u nich snížena citlivost na ionty Li^+ a K^+ . To dokazuje, že se oba proteiny podílí na udržení homeostáze. Navíc exprese lgl proteinu *D. Melanogaster* l(2)gl dokázala částečně potlačit mutantní fenotyp *sro7/sro77* (Larsson et al., 1998). Další práce ukázala, že podstata této komplementace závisí na konzervované WD40 doméně (Kim et al., 2005).

Schopnost komplementace kvasinkové *sro7/sro77* mutace byla studovaná také u rostlinných tomosynů izolovaných z *Arabidopsis thaliana*. Bylo zjištěno, že schopnost komplementace dvojitých mutantů *sro7/sro77* měl pouze jeden ze dvou tomosynů, konkrétně AtTYN2 (At4g35560) (Forsmark, 2009). Tato práce došla k závěru, že hlavním důvodem tohoto rozdílu bylo, že AtTYN2, na rozdíl od AtTYN1 (At5g05570), neobsahuje na svém C-konci R-SNARE doménu. Nicméně naše analýza proteinové sekvence AtTYN2 pomocí CD-

Search dostupného na NCBI ukázala, že na svém C-terminálním konci mají anotovanou R-SNARE doménu oba rostlinné tomosyny. Je tedy pravděpodobnější, že za neschopností AtTYN1 komplementovat fenotyp *sro7/sro77* stojí rozdílné vlastnosti WD40 domény.

Obr. 20 ukazuje rozdělení lgl proteinů a tomosynů na dva klastry a podobný obrázek vidíme i u rostlin. Segregace dvou klastrů je patrná záhy po přechodu rostlin na souš. Zajímavé je, že u výtrusných rostlin se homolog AtTYN2 neudržel a byl sekundárně ztracen. Může to souviset s jeho rolí ve vývoji spermatické buňky pylu (Borg et al., 2011), která zajistila jeho udržení a specializaci u semenných rostlin.



Obr. 20: Fylogenetická analýza rodiny Lgl v eukaryotech. Sekvence lgl proteinů a tomosynů vytvářejí odlišné klastry. Naopak kvasinkové Sro7/Sro77 a Lgl protein *C. elegans* úzce souvisí jak s rodinou Lgl, tak rodinou tomosynů. Převzato z Vasioukhin, 2006.

4.3. Interaktory tomosynů u kvasinek, živočichů a rostlin

Z dostupné literatury bylo zjištěno, že kvasinkové homology tomosynu Sro7/77 interagují s myosiny, konkrétně Myo1p a Myo2p, který lokalizuje Sro7 na plazmatickou membránu. (Kagami et al., 1998; Rossi a Brenwald, 2011). Dalším známý interaktor patří mezi kvasinkové SNARE proteiny, jedná se konkrétně o Sec9, homolog SNAP-25. Sec9 neobsahuje transmembránovou doménu, a proto je jedna z rolí Sro7 lokalizace proteinu Sec9 na membránu a následná regulace fúzování váčků (Lehman et al., 1999). Prozkoumána je také interakce Sro7 s Rab GTPázou Sec4. Protein Sro7 je schopen interagovat pouze s aktivovanou formou Sec4 GTPázy a pravděpodobně působí jako její downstream efektor (Grosshans et al., 2006). Sro7/77 poutá váčky na plazmatickou membránu také prostřednictvím vazby na N-terminální doménu exocystní podjednotky Exo84 (Zhang et al., 2005). Známými interaktory Sro7 jsou také kinázy Kin1/2, což jsou homology Par1 (Elbert et al., 2004). Také živočišný tomosyn interaguje se SNARE proteiny. Známá je interakce se syntaxiny, kdy byla popsána interakce tomosynu se syntaxinem-1 a syntaxinem-4 (Fujita et al., 1998, Widberg et al., 2003). Tomosyn interaguje také s dalším SNARE proteinem, nacházejícím se na plazmatické membráně, konkrétně SNAP23 a SNAP25 (Widberg et al., 2003; Hatsuzawa et al., 2003). Prokázána byla také interakce tomosynu s kinázami regulujícími aktivitu tomosynu. Jedná se konkrétně o proteinkinázu A, kinázy Akt1, Akt2 a cyklindependentní kinázu 5. Proteinkináza A fosforyluje tomosyn-1, a tím zablokuje jeho vazbu na syntaxin-1 (Baba et al., 2005). Podobně fungují kinázy Akt1 a Akt2, které fosforylují b-tomosyn-1 a tím inhibují interakci se syntaxinem-4 (Nagano et al., 2015). Tomosyn fosforyluje také zmíněná Cdk5 a tím ovlivňuje distribuci váčků mezi presynaptickými pooly (Cazares et al., 2016). Dalšími studovanými interaktory tomosynu je E3 ligáza Hrd1 zodpovědná za degradaci tomosynu-2 a PIASy stojící za sumoylací tomosynu-1. (Bhatnagar et al., 2014; Geerts et al., 2014). Tomosyn také interaguje s aktivovaným Rab proteinem Rab3A. V případě fosforylovaného tomosynu kinázou Cdk5 se na komplex tomosyn-Rab3A váže ještě synapsin1 a společně tak omezují uvolňování synaptických vezikul (Cazares et al., 2016). Naše testování potenciálních interakcí obou rostlinných tomosynů prostřednictvím dvouhybridního kvasinkového systému bylo tedy zaměřeno na proteiny těchto skupin. Testovány byly jak vybrané podjednotky exocystu, tak

i SNARE proteiny. Interakce byly testovány také plošně pomocí cDNA, nicméně žádný interaktor nalezen nebyl.

Jedním z možných důvodů neúspěchu je ten, že se fúzní protein LexA-tomosyn v kvasinkách neexprimuje, nebo není správně složen. Expresi proteinu by bylo možné testovat pomocí protilátky proti DNA vazebné doméně LexA proteinu, ale bohužel firma DualSystems již ukončila produkci komponent dvouhybridního systému včetně protilátky a nepodařilo se nám ji získat ani z alternativních zdrojů. Možným řešením by bylo do budoucna využít fúzní protein GFP-tomosyn exprimovaný přímo v rostlinách, který by mohl, po optimalizaci exprese, sloužit pro koimunoprecipitaci a identifikaci interaktorů.

4.4. Lokalizace tomosynu u živočichů, kvasinek a rostlin

Lokalizace Sro7 byla spolu s dalšími sekrečními faktory studována zejména v dělicích se kvasinkách označením jeho mRNA. V G1 fázi buněk se mRNA lokalizuje na místo blízko buněčného povrchu, konkrétně do míst budoucího vzniku pupene. V brzké G2/M fázi se před jaderným dělením nachází v pupeni a po mitóze je symetricky distribuován v mateřské a dceřinné buňce. Také bylo sledováno, zda se mRNA a protein daného genu rozdílně lokalizuje. Bylo zjištěno, že mRNA dorazí do míst vzniku pupene dříve než jeho proteinový produkt. Tímto způsobem zřejmě přispívá k depozici proteinu v místě polarizovaného růstu. Nicméně proteiny, obsahující transmembránovou doménu, se dokážou lokalizovat i v případě ztráty mRNA. To však není případ Sro7, protože transmembránovou doménu neobsahuje. Lokalizace mRNA Sro7 závisí také na SHE komplexu a funkčním aktinovém cytoskeletu, ostatně se v kódující sekvenci Sro7 nachází konsensuální motiv pro vazbu She2p (Aronov et al., 2007). Během párování kvasinek se mRNA lokalizuje v místě polarizovaného růstu, směrem k partnerovi. Transkripty SRO7 se společně se SEC3 nacházejí v blízkosti tubulárního ER a akumulují se v místě růstu výběžku (tzv. „shmoo“) a zároveň syntetizuje protein (Gelin-Licht et al., 2012). Pozorována byla také lokalizace Sro7 a Myo1p v krčku pupene a v cytosolu (Kagami et al., 1998). Sro7 se v kvasinkových buňkách lokalizuje také na povrch plazmatické membrány a to zřejmě prostřednictvím Sec9 (Hattendorf et al., 2007). Tomosyny se exprimují převážně v mozku, je známa také izoforma b-tomosyn exprimující se v různých tkáních (Baba et al., 2005; Groffen et al., 2005). V SSG

buňkách se tomosyn lokalizuje v presynaptické části neuronu, nicméně u tomosynu-2 byla nalezena také postsynaptická lokalizace (Barak et al., 2010). Podobně jako u Sro7 neobsahuje žádný z isoform tomosynu transmembránovou doménu, takže byl lokalizován také v cytosolu (Pobbati et al., 2004). Další podobnosti s kvasinkovým homologem je, že se tomosyn skrze syntaxin lokalizuje také na povrch plazmatické membrány (Widberg et al., 2003). Tomosyn byl také nalezen asociovaný se synaptickými vezikuly a granulemi obsahujícími inzulin (McEwen et al., 2006; Cheviet et al., 2006). Rostlinný tomosyn AtTYN2 exprimující GFP pod 35S promotorem byl lokalizován v cytoplasmě, podobně jako Sro7 a živočišný tomosyn. Zvýšená exprese byla zaznamenána v průduších rostliny, naopak AtTYN2 nebyl lokalizován v kořenech. Analýza expresních dat však expresi v kořenech nevyloučila. Expresi tomosynů v kořenech také nepřímo potvrzují homozygotní T-DNA inzerční mutanti, kteří vykazovali defekt v tvorbě laterálních kořenů (Forsmark, 2009). Fluorescenční signál tak nemusel být pozorován z důvodu RNA interference, čemuž nasvědčuje také zvýšená exprese v průduších. Zralé průduchové buňky nejsou součástí cytoplazmatického kontinua, a tak je transport RNAi signálu možný pouze do nezralých průduchů, protože ta zatím neztratila plazmodezmatální propojení s ostatními buňkami (Jose a Hunter, 2007).

Ačkoli tato práce nepřinesla odpovědi na mnohé otázky, přesto pokládá základy pro budoucí výzkum v této důležité oblasti. Pro budoucnost bude dobré využití studia inzerčních mutantů v obou genech pro tomosyny v *A. thaliana* a ve využití proteomických metod pro nalezení jejich interakčních partnerů. Otevřená zůstává nadále také otázka redundance obou tomosynů v rostlinné buňce.

5. Závěr

Cílem této práce bylo charakterizovat oba rostlinné tomosyny nacházející se v *Arabidopsis thaliana*.

Prvním dílčím cílem byla bioinformatická analýza. Vytvořený fylogenetický strom odhalil, že se rostlinné homology dělí do dvou odlišných klastrů, přičemž v klastru s homologem AtTYN2 se nenachází žádný zástupce výtrusných rostlin. Výtrusné rostliny svůj tomosyn-2 v průběhu evoluce sekundárně ztratily. Expresní data neodhalila výrazně vysokou expresi v některém rostlinném pletivu. Lehce zvýšená exprese byla zaznamenána u AtTYN1 v kořenech, konkrétně v kořenové špičce a elongační a maturační zóně. Exprese AtTYN2 se zvyšuje v pylu, stélé a spermatických buňkách. Kromě toho je jeho exprese výrazně ovlivněna osmotickým stresem. Naopak AtTYN1 patří mezi konstitutivní geny, jejichž exprese není nijak zásadně ovlivněna.

Dalším cílem byla příprava konstruktů určených pro sledování buněčné lokalizace a hledání interaktorů pomocí dvouhybridního kvasinkového systému. Oba rostlinné tomosyny a jejich C-terminální domény se podařilo zaklonovat do vektoru pGWB6 pro N-terminální fúzi GFP pod 35S promotorem. Homolog AtTYN1 byl zaklonován také do vektoru pUBN-GFP-DEST pro N-terminální fúzi GFP pod ubivitinovým promotorem. Oba tomosyny byly zaklonovány také do vektoru p-LexA-N, který byl využíván ve dvouhybridním kvasinkovém systému.

Buněčná lokalizace byla sledována ve stabilně transformovaných rostlinách *Arabidopsis thaliana*. Vzhledem k dlouhodobým neúspěchům při klonování AtTYN1 do vektoru pGWB6 a nefunkčnosti vektoru pUBN-GFP-AtTYN1, byla sledována pouze lokalizace AtTYN2. V rostlinné buňce se AtTYN2, podobně jako u živočichů a kvasinek, lokalizoval v cytoplasmě. V průduchových buňkách byla zaznamenána jeho zvýšená exprese, naopak v kořenech nebyl AtTYN2 lokalizován vůbec. Existuje tedy důvodné podezření, že byl fluorescenční signál ovlivněn RNA interferencí.

Dvouhybridním kvasinkovým systémem byly hledány interaktoři obou tomosynů a to jak pomocí cDNA knihovny, tak i párovými interakcemi. Ani v jednom případě nebyl bohužel nalezen žádný interaktor. To mohlo být způsobeno faktem, že se fúzní protein LexA-

tomosyn v kvasinkách neexprimuje nebo není správně složen. Vzhledem k absenci protilátky proti DNA vazebné doméně Lex-A, nebylo možno tuto hypotézu ověřit.

6. Seznam použité literatury

ARONOV, S., R. GELIN-LICHT, G. ZIPOR, L. HAIM, E. SAFRAN a J. E. GERST, 2007. mRNAs Encoding Polarity and Exocytosis Factors Are Cotransported with the Cortical Endoplasmic Reticulum to the Incipient Bud in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 27(9), 3441–3455.

ASHERY, Uri, Noa BIELOPOLSKI, Boaz BARAK a Ofer YIZHAR, 2009. Friends and foes in synaptic transmission: the role of tomosyn in vesicle priming. *Trends in Neurosciences* [online]. 32(5), 275–282.

GUINDON, Stéphane, Jean-françois DUFAYARD a Vincent LEFORT, 2010. *New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0* [online].

HOUSKOVÁ, A. *Identification and characterization of proteins interacting with plant formins*. Praha. 2015. Diplomová práce (Mgr.). Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta.

BABA, Takeshi, Toshiaki SAKISAKA, Sumiko MOCHIDA a Yoshimi TAKAI, 2005. PKA-catalyzed phosphorylation of tomosyn and its implication in Ca^{2+} -dependent exocytosis of neurotransmitter. *Journal of Cell Biology* [online]. 170(7), 1113–1125.

BARAK, Boaz, Eitan OKUN, YOAV, Ben-Simon, Ayal LAVI, Ronit SHAPIRA, RAVIT, Madar, Yue WANG, Eric NORMAN, Anton SHEININ, Mario A PITA, OFER, Yizhar, Mohamed R MUGHAL, Edward STUENKEL, Henriette VAN, Praag, Mark P MATTSON a Uri ASHERY, 2013. Neuron-Specific Expression of Tomosyn1 in the Mouse Hippocampal Dentate Gyrus Impairs Spatial Learning and Memory. *NeuroMolecular Medicine*. 15, 51–363.

BARAK, Boaz, Antionette WILLIAMS, Noa BIELOPOLSKI, Irit GOTTFRIED, Eitan OKUN, Meghan A. BROWN, Ulf MATTI, Jens RETTIG, Edward L. STUENKEL a Uri ASHERY, 2010. Tomosyn Expression Pattern in the Mouse Hippocampus Suggests Both Presynaptic and Postsynaptic Functions. *Frontiers in Neuroanatomy* [online]. 4(December), 1–11.

BATTEN, Seth R., Elena A. MATVEEVA, Sidney W. WHITEHEART, Thomas C. VANAMAN, Greg A. GERHARDT a John T. SLEVIN, 2017. Linking kindling to increased glutamate release in the dentate gyrus of the hippocampus through the STXBP5/tomosyn-1 gene. *Brain and Behavior* [online]. 1-11.

BEZNOUSSENKO, Galina V., Seetharaman PARASHURAMAN, Riccardo RIZZO, Roman POLISHCHUK, Oliviano MARTELLA, Daniele Di GIANDOMENICO, Aurora FUSELLA, Alexander SPAAR, Michele SALLESE, Maria Grazia CAPESTRANO, Margit PAVELKA, Matthijn R. VOS, Yuri G.M. RIKERS, Volkhard HELMS, Alexandre A. MIRONOV a Alberto LUINI, 2014. Transport of soluble proteins through the Golgi occurs by diffusion via continuities across cisternae. *eLife* [online]. 2014(3), 1–27.

BHATNAGAR, Sushant, Angie T. OLER, Mary E. RABAGLIA, Donald S. STAPLETON, Kathryn L. SCHUELER, Nathan A. TRUCHAN, Sara L. WORZELLA, Jonathan P. STOEHR, Susanne M.

- CLEE, Brian S. YANDELL, Mark P. KELLER, Debbie C. THURMOND a Alan D. ATTIE, 2011. Positional cloning of a type 2 diabetes quantitative trait locus; Tomosyn-2, a negative regulator of insulin secretion. *PLoS Genetics* [online]. 7(10), 1-11.
- BHATNAGAR, Sushant, Mufaddal S. SONI, Lindsay S. WRIGHTON, Alexander S. HEBERT, Amber S. ZHOU, Pradyut K. PAUL, Trillian GREGG, Mary E. RABAGLIA, Mark P. KELLER, Joshua J. COON a Alan D. ATTIE, 2014. Phosphorylation and degradation of tomosyn-2 de-represses insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 289(36), 25276-25286.
- BIELOPOLSKI, Noa, Alice D. LAM, Dana BAR-ON, Markus SAUER, Edward L. STUENKEL a Uri ASHERY, 2014. Differential interaction of tomosyn with syntaxin and SNAP25 depends on domains in the WD40 β -propeller core and determines its inhibitory activity. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 289(24), 17087–17099.
- BORG, Michael, Lynette BROWNFIELD, Hoda KHATAB, Anna SIDOROVA, Melanie LINGAYA a David TWELL, 2011. The R2R3 MYB Transcription Factor DUO1 Activates a Male Germline-Specific Regulon Essential for Sperm Cell Differentiation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* [online]. 23(2), 534–549.
- BRENNWALD, Patrick, Brian KEARNS, Kathy CHAMPION, Sirkka KERÄNEN, Vytas BANKAITIS a Peter NOVICK, 1994. Sec9 is a SNAP-25-like component of a yeast SNARE complex that may be the effector of Sec4 function in exocytosis. *Cell* [online]. 79(2), 245–258.
- BURGOYNE, Robert D., Jeff W. BARCLAY, Leo F. CIUFO, Margaret E. GRAHAM, Mark T.W. HANDLEY a Alan MORGAN, 2009. The functions of Munc18-1 in regulated exocytosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 1152, 76–86.
- CAO, Pengfei, Luciana RENNA, Giovanni STEFANO a Federica BRANDIZZI, 2016. SYP73 Anchors the ER to the Actin Cytoskeleton for Maintenance of ER Integrity and Streaming in *Arabidopsis*. *Current Biology* [online]. B.m.: Elsevier Ltd., 26(23), 3245–3254.
- CAZARES, V. A., M. M. NJUS, A. MANLY, J. J. SALDATE, A. SUBRAMANI, Y. BEN-SIMON, M. A. SUTTON, U. ASHERY a E. L. STUENKEL, 2016. Dynamic Partitioning of Synaptic Vesicle Pools by the SNARE-Binding Protein Tomosyn. *Journal of Neuroscience* [online]. 36(44), 11208–11222.
- CUKIER, Holly N., Nicole D. DUEKER, Susan H. SLIFER, Joycelyn M. LEE, Patrice L. WHITEHEAD, Eminisha LALANNE, Natalia LEYVA, Ioanna KONIDARI, Ryan C. GENTRY, William F. HULME, Derek Van BOOVEN, Vera MAYO, Natalia K. HOFMANN, Michael A. SCHMIDT, Eden R. MARTIN, Jonathan L. HAINES, Michael L. CUCCARO, John R. GILBERT a Margaret A. PERICAK-VANCE, 2014. Exome sequencing of extended families with autism reveals genes shared across neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *Molecular Autism* [online]. 5(1), 1–10.
- DAVIS, L. K., K. J. MEYER, D. S. RUDD, A. L. LIBRANT, E. A. EPPING, V. C. SHEFFIELD a T. H. WASSINK, 2009. Novel copy number variants in children with autism and additional developmental anomalies. *Journal of Neurodevelopmental Disorders* [online]. 1(4), 292–301.

- DI SANSEBASTIANO, G. P., M. FARACO, J. ZOUHAR a G. DALESSANDRO, 2009. The study of plant SNAREs specificity in vivo. *Plant Biosystems* [online]. 143(3), 621–629.
- DYBBS, Michael, John NGAI a Joshua M. KAPLAN, 2005. Using microarrays to facilitate positional cloning: Identification of tomosyn as an inhibitor of neurosecretion. *PLoS Genetics* [online]. 1(1), 6-16.
- ELBERT, M., 2004. The Yeast Par-1 Homologs Kin1 and Kin2 Show Genetic and Physical Interactions with Components of the Exocytic Machinery. *Molecular Biology of the Cell* [online]. 16(2), 532–549.
- ESTEBAN S. MASUDA, BETTY C. B. HUANG, JOSEPH M. FISHER, YING LUO, and Richard H. Scheller, 1998. Tomosyn Binds t-SNARE Proteins via a VAMP-like Coiled Coil. *Neuron* [online]. 21, 479–480.
- FARQUHAR, Marilyn G. a George E. PALADE, 1998. The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends in Cell Biology* [online]. 8(1), 2–10.
- FENDRYCH, Matyáš, Lukáš SYNEK, Tamara PEČENKOVÁ, Hana TOUPALOVÁ, Rex COLE, Edita DRDOVÁ, Jana NEBESÁŘOVÁ, Miroslava ŠEDINOVÁ, Michal HÁLA, John E. FOWLER a Viktor ŽÁRSKÝ, 2010. The *Arabidopsis* Exocyst Complex Is Involved in Cytokinesis and Cell Plate Maturation. *The Plant Cell* [online]. 22(9), 3053–3065.
- KIENLE, Nickias, Tobias H. KLOEPPER a Dirk FASSHAUER, 2009. Phylogeny of the SNARE vesicle fusion machinery yields insights into the conservation of the secretory pathway in fungi. *BMC Evolutionary Biology* [online]. 9(1), 1–14.
- FORSMARK, A. *Functional characterisation of the yeast yeast tumour suppressor homologue Sro7p*. Göteborg. 2009. Akademisk avhandling. Göteborgs universitet. Department of Cell and Molecular Biology.
- FUJITA, Yasuyuki, Hiromichi SHIRATAKI, Toshiaki SAKISAKA, Takeshi ASAKURA, Takeshi OHYA, Hirokazu KOTANI, Shigekazu YOKOYAMA, Hideo NISHIOKA, Yoshiharu MATSUURA, Akira MIZOGUCHI, Richard H. SCHELLER a Yoshimi TAKAI, 1998. Tomosyn: A syntaxin-1-binding protein that forms a novel complex in the neurotransmitter release process. *Neuron* [online]. 20(5), 905–915.
- FUNG, B K K, 1983. Characterization of transducin from bovine retinal rod outer segments. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 258(17), 10503–10510.
- GEERTS, Cornelia J., Linda JACOBSEN, Rhea VAN DE BOSPOORT, Matthijs VERHAGE a Alexander J A GROFFEN, 2014. Tomosyn interacts with the SUMO E3 ligase PIASγ. *PLoS ONE* [online]. 9(3), 1-8.
- GEERTS, Cornelia J., Roberta MANCINI, Ning CHEN, Frank T.W. KOOPMANS, Ka Wan LI, August B. SMIT, Jan R.T. VAN WEERING, Matthijs VERHAGE a Alexander J.A. GROFFEN, 2017. Tomosyn associates with secretory vesicles in neurons through its N- and C-terminal domains. *PLoS ONE* [online]. 12(7), 1-23.

- GELIN-LICHT, Rita, Saurabh PALIWAL, Patrick CONLON, Andre LEVCHENKO a Jeffrey E. GERST, 2012. Scp160-Dependent mRNA Trafficking Mediates Pheromone Gradient Sensing and Chemotropism in Yeast. *Cell Reports* [online]. 1(5), 483–494.
- GERST, Jeffrey E., 2003. *SNARE regulators: Matchmakers and matchbreakers* [online]. 1641 (2003) 99–110.
- GLADYCHEVA, Svetlana E., Alice D. LAM, Jiang LIU, Matthew D'ANDREA-MERRINS, Ofer YIZHAR, Stephen I. LENTZ, Uri ASHERY, Stephen A. ERNST a Edward L. STUENKEL, 2007. Receptor-mediated regulation of tomosyn-syntaxin 1A interactions in bovine adrenal chromaffin cells. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 282 (31), 22887–22899.
- GORING DAPHNE R., Sansebastiano Gian Pietro Di, 2017. Protein and membrane trafficking routes in plants : conventional or unconventional ? *Journal of Experimental Botany*. 69(December), 1–5.
- GÖRLICH, Dirk, 1998. Transport into and out of the cell nucleus. *EMBO Journal* [online]. 17(10), 2721–2727.
- GOUD, Bruno, Antti SALMINEN, Nancy C. WALWORTH a Peter J. NOVICK, 1988. A GTP-binding protein required for secretion rapidly associates with secretory vesicles and the plasma membrane in yeast. *Cell* [online]. 53(5), 753–768.
- GRACHEVA, E. O., A. O. BURDINA, D. TOUROUTINE, M. BERTHELOT-GROSJEAN, H. PAREKH a J. E. RICHMOND, 2007. Tomosyn Negatively Regulates CAPS-Dependent Peptide Release at *Caenorhabditis elegans* Synapses. *Journal of Neuroscience* [online]. 27(38), 10176–10184.
- GRACHEVA, Elena O., Anna O. BURDINA, Andrea M. HOLGADO, Martine BERTHELOT-GROSJEAN, Brian D. ACKLEY, Gayla HADWIGER, Michael L. NONET, Robby M. WEIMER a Janet E. RICHMOND, 2006. Tomosyn inhibits synaptic vesicle priming in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biology* [online]. 4 (8), 1426–1437.
- GROFFEN, Alexander J A, Linda JACOBSEN, Désirée SCHUT a Matthijs VERHAGE, 2005. Two distinct genes drive expression of seven tomosyn isoforms in the mammalian brain, sharing a conserved structure with a unique variable domain. *Journal of Neurochemistry* [online]. 92(3), 554–568.
- GROFFEN, 2015. Tomosyn-2 is required for normal motor performance in mice and sustains neurotransmission at motor endplates. *Brain Structure and Function* [online]. 2015 (220), 1971–1982.
- GROSSHANS, Bianka L., Anna ANDREEVA, Akanksha GANGAR, Sherry NIESSEN, John R. YATES, Patrick BRENNWALD a Peter NOVICK, 2006. The yeast Igl family member Sro7p is an effector of the secretory Rab GTPase Sec4p. *Journal of Cell Biology* [online]. 172 (1), 55–66.

- HÁLA, M., R. COLE, L. SYNEK, E. DRDOVÁ, T. PEČENKOVÁ, A. NORDHEIM, T. LAMKEMEYER, J. MADLUNG, F. HOCHHOLDINGER, J. E. FOWLER a V. ŽÁRSKÝ, 2008. An Exocyst Complex Functions in Plant Cell Growth in Arabidopsis and Tobacco. *the Plant Cell Online* [online]. 20(5), 1330–1345.
- HATSUZAWA, Kiyotaka, Thorsten LANG, Dirk FASSHAUER, Dieter BRUNS a Reinhard JAHN, 2003. The R-SNARE motif of tomosyn forms SNARE core complexes with syntaxin 1 and SNAP-25 and down-regulates exocytosis. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 278(33), 31159–31166.
- HATTENDORF, Douglas A, Anna ANDREEVA, Akanksha GANGAR, Patrick J BRENNWALD a William I WEIS, 2007. Structure of the yeast polarity protein Sro7 reveals a SNARE regulatory mechanism. *Nature* [online]. 44, 567-571.
- HE, Enqi, Keimpe WIERDA, Rhode VAN WESTEN, Jurjen H. BROEKE, Ruud F. TOONEN, L. Niels CORNELISSE a Matthijs VERHAGE, 2017. Munc13-1 and Munc18-1 together prevent NSF-dependent de-priming of synaptic vesicles. *Nature Communications* [online]. 8(May), 1–10.
- HRUZ, Tomas, Oliver LAULE, Gabor SZABO, Frans WESSENDORP, Stefan BLEULER, Lukas OERTLE, Peter WIDMAYER, Wilhelm GRUISSEM a Philip ZIMMERMANN, 2008. Genevestigator V3: A Reference Expression Database for the Meta-Analysis of Transcriptomes. *Advances in Bioinformatics* [online]. 2008, 1–5.
- HU, Kuang, Joe CARROLL, Colin RICKMAN a Bazbek DAVLETOV, 2002. Action of complexin on SNARE complex. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 277(44), 41652–41656.
- CHEN, K., A. RICHLITZKI, D. E. FEATHERSTONE, M. SCHWARZEL a J. E. RICHMOND, 2011. Tomosyn-dependent regulation of synaptic transmission is required for a late phase of associative odor memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 108 (45), 18482–18487.
- CHEVIET, Séverine, Paola BEZZI, Rosita IVARSSON, Erik RENSTRÖM, David VIERTL, Sandor KASAS, Stefan CATSICAS a Romano REGAZZI, 2006. Tomosyn-1 is involved in a post-docking event required for pancreatic beta-cell exocytosis. *Journal of cell science* [online]. 119(14), 2912–2920.
- JAHN, Reinhard a Richard H. SCHELLER, 2006. SNAREs-Engines for membrane fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 7(9), 631–643.
- JOSE, Antony M. a Craig P. HUNTER, 2007. Transport of Sequence-Specific RNA Interference Information Between Cells. *Annual Review of Genetics* [online]. 41(1), 305–330.
- KAGAMI, Mitsuhiro, Akio TOH-E a Yasushi MATSUI, 1998. Sro7p, a *Saccharomyces cerevisiae* counterpart of the tumor suppressor l(2)gl protein, is related to myosins in function. *Genetics*. 149, 1717–1727.
- KIM, Yu Kyung, Yong Soo KIM a Kwang Hyun BAEK, 2005. The WD-40 repeat motif of Lgl tumor suppressor proteins associated with salt tolerance and temperature sensitivity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 331(4), 922–928.

- KLOEPPER, Tobias H., C. Nickias KIENLE a Dirk FASSHAUER, 2008. SNAREing the basis of multicellularity: Consequences of protein family expansion during evolution. *Molecular Biology and Evolution* [online]. 25(9), 2055–2068.
- KOUMANDOU, V. Lila, Joel B. DACKS, Richard M.R. COULSON a Mark C. FIELD, 2007. Control systems for membrane fusion in the ancestral eukaryote; Evolution of tethering complexes and SM proteins. *BMC Evolutionary Biology* [online]. 7, 1–17.
- LARSSON, Katrin, Florian BÖHL, Ingrid SJÖSTRÖM, Noreen AKHTARL, Dieter STRAND, Bernard M. MECHLER, Reiner GRABOWSKI a Lennart ADLER, 1998. The *Saccharomyces cerevisiae* SOP1 and SOP2 genes, which act in cation homeostasis, can be functionally substituted by the *Drosophila* lethal(2)giant larvae tumor suppressor gene. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 273(50), 33610–33618.
- VASIOUKHIN, Valeri, 2006. Lethal giant puzzle of Lgl. *Developmental Neuroscience* [online]. 28(1–2), 13–24.
- LEHMAN, Kevin, Guendalina ROSSI, Joan E. ADAMO a Patrick BRENNWALD, 1999. Yeast homologues of tomosyn and lethal giant larvae function in exocytosis and are associated with the plasma membrane SNARE, Sec9. *Journal of Cell Biology* [online]. 146, 125–140.
- LI, Yun, Shen WANG, Tianzhi LI, Le ZHU a Cong MA, 2018. Tomosyn guides SNARE complex formation in coordination with Munc18 and Munc13. *FEBS Letters* [online]. 592(7), 1161–1172.
- LIPKA, Volker, Chian KWON a Ralph PANSTRUGA, 2007. SNARE-Ware: The Role of SNARE-Domain Proteins in Plant Biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* [online]. 23(1), 147–174.
- LOBINGIER, B. T. a A. J. MERZ, 2012. Sec1/Munc18 protein Vps33 binds to SNARE domains and the quaternary SNARE complex. *Molecular Biology of the Cell* [online]. 23(23), 4611–4622.
- MA, Cong, Wei LI, Yibin XU a Josep RIZO, 2011. Munc13 mediates the transition from the closed syntaxin-Munc18 complex to the SNARE complex. *Nature Structural and Molecular Biology* [online]. 18(5), 542–549.
- MCEWEN, Jason M., Jon M. MADISON, Michael DYBBS a Joshua M. KAPLAN, 2006. Antagonistic Regulation of Synaptic Vesicle Priming by Tomosyn and UNC-13. *Neuron* [online]. 51(3), 303–315.
- MORGERA, F., M. R. SALLAH, M. L. DUBUKE, P. GANDHI, D. N. BREWER, C. M. CARR a M. MUNSON, 2012. Regulation of exocytosis by the exocyst subunit Sec6 and the SM protein Sec1. *Molecular Biology of the Cell* [online]. 23(2), 337–346.
- NAGANO, Koki, Hiroshi TAKEUCHI, Jing GAO, Yoshihide MORI, Takahito OTANI, Daguang WANG a Masato HIRATA, 2015. Tomosyn is a novel Akt substrate mediating insulin-dependent GLUT4 exocytosis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* [online]. 62, 62–71.

- NICKEL, Walter a Matthias SEEDORF, 2008. Unconventional Mechanisms of Protein Transport to the Cell Surface of Eukaryotic Cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* [online]. 24(1), 287–308.
- POBBATI, Ajaybabu V., Adelia RAZETO, Matthias BÖDDENER, Stefan BECKER a Dirk FASSHAUER, 2004. Structural basis for the inhibitory role of tomosyn in exocytosis. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 279 (45), 47192–47200.
- ROSSI, G. a P. BRENNWALD, 2011. Yeast homologues of lethal giant larvae and type V myosin cooperate in the regulation of Rab-dependent vesicle clustering and polarized exocytosis. *Molecular Biology of the Cell* [online]. 22, 842-857.
- ROSSI, Guendalina, Kelly WATSON, Mallory DEMONCH, Brenda TEMPLE a Patrick BRENNWALD, 2015. In vitro reconstitution of Rab GTPase-dependent vesicle clustering by the yeast lethal giant larvae/tomosyn homolog, Sro7. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 290(1), 612–624.
- ROSSI, Guendalina, Kelly WATSON, Wade KENNEDY a Patrick BRENNWALD, 2018. The tomosyn homologue, Sro7, is a direct effector of the Rab GTPase, Sec4, in post-Golgi vesicle tethering. *Molecular Biology of the Cell* [online]. 29(12), 1476–1486
- RUTHERFORD, Karen a Valerie DAGGETT, 2010. Polymorphisms and disease: Hotspots of inactivation in methyltransferases. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 35(10), 565–574.
- PRATELLI, Réjane, Jens U. SUTTER a Michael R. BLATT, 2004. A new catch in the SNARE. *Trends in Plant Science* [online]. 9(4), 187–195.
- SAKISAKA, Toshiaki, Takeshi BABA, Shintaro TANAKA, Genkichi IZUMI, Masato YASUMI a Yoshimi TAKAI, 2004. Regulation of SNAREs by tomosyn and ROCK: Implication in extension and retraction of neurites. *Journal of Cell Biology* [online]. 166(1), 17–25.
- SAKISAKA, Toshiaki, Yasunori YAMAMOTO, Sumiko MOCHIDA, Michiko NAKAMURA, Kouki NISHIKAWA, Hiroyoshi ISHIZAKI, Miki OKAMOTO-TANAKA, Jun MIYOSHI, Yoshinori FUJIYOSHI, Toshiya MANABE a Yoshimi TAKAI, 2008. Dual inhibition of SNARE complex formation by tomosyn ensures controlled neurotransmitter release. *Journal of Cell Biology* [online]. 183 (2), 323–337.
- SALDATE, Johnny J., Jason SHIAU, Victor A. CAZARES a Edward L. STUENKEL, 2018. The ubiquitin-proteasome system functionally links neuronal Tomosyn-1 to dendritic morphology. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 293(7), 2232–2246.
- SANDERFOOT, A., 2007. Increases in the Number of SNARE Genes Parallels the Rise of Multicellularity among the Green Plants. *Plant Physiology* [online]. 144(1), 6–17.
- SCHAPIRE, A. L., B. VOIGT, J. JASIK, A. ROSADO, R. LOPEZ-COBOLLO, D. MENZEL, J. SALINAS, S. MANCUSO, V. VALPUESTA, F. BALUSKA a M. A. BOTELLA, 2008. Arabidopsis Synaptotagmin 1 Is Required for the Maintenance of Plasma Membrane Integrity and Cell Viability. *the Plant Cell Online* [online]. 20(12), 3374–3388.

- SÜDHOF, Thomas C., 2013. Neurotransmitter release: The last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron* [online]. 80(3), 675–690.
- SUTTER, Jens Uwe, Prisca CAMPANONI, Michael R. BLATT a Manuel PANEQUE, 2006. Setting SNAREs in a different wood. *Traffic* [online]. 7(6), 627–638.
- TAKEUCHI, Seiji, Shintaro IWAMA, Hiroshi TAKAGI, Atsushi KIYOTA, Kohtaro NAKASHIMA, Hisakazu IZUMIDA, Haruki FUJISAWA, Naoko IWATA, Hidetaka SUGA, Takashi WATANABE, Kozo KAIBUCHI, Yutaka OISO, Hiroshi ARIMA a Yoshihisa SUGIMURA, 2016. Tomosyn negatively regulates arginine vasopressin secretion in embryonic stem cell-derived neurons. *PLoS ONE* [online]. 1-21.
- TERBUSH DANIEL, MAURICE TRINA, ROTH DAGMAR, Novick Peter, 1996. The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*. 15(23), 6483–6494.
- TOGNERI, JOHN, YI-SHAN CHENG, MARY MUNSON, FREDERICK M. HUGHSON, and Chavala M. Carr, 2006. Specific SNARE complex binding mode of the Sec1/Munc-18 protein, Sec1p. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 103(47), 17730–17735.
- TREXLER, Adam J, Kem A SOCHACKI, Justin W TARASKA a Thomas F J MARTIN, 2016. Imaging the recruitment and loss of proteins and lipids at single sites of calcium-triggered exocytosis [online]. 27, 2423–2434. VIOTTI, Corrado, 2016. ER to Golgi-Dependent Protein Secretion: The Conventional Pathway [online]. 27, 2423–2434.
- WADSKOG, Ingrid, Annabelle FORSMARK, Guendalina ROSSI, Catherine KONOPKA, Mattias YEN, Mattias GOKSÖ, Hans RONNE, Patrick BRENNWALD a Lennart ADLER, 2006. The Yeast Tumor Suppressor Homologue Sro7p Is Required for Targeting of the Sodium Pumping ATPase to the Cell Surface □ D. *Molecular Biology of the Cell* [online]. 17, 4988–5003.
- WADSKOG, Ingrid, Corinna MALDENER, Astrid PROKSCH, Frank MADEO a Lennart ADLER, 2004. Yeast Lacking the SRO7/SOP1-encoded Tumor Suppressor Homologue Show Increased Susceptibility to Apoptosis-like Cell Death on Exposure to NaCl Stress. *Molecular Biology of the Cell* [online]. 15, 1436–1444.
- WIDBERG, Charlotte H., Nia J. BRYANT, Milena GIROTTI, Shane REA a David E. JAMES, 2003. Tomosyn interacts with the t-SNAREs syntaxin4 and SNAP23 and plays a role in insulin-stimulated GLUT4 translocation. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 278 (37), 35093–35101.
- WILLIAMS, Antionette L., Noa BIELOPOLSKI, Daphna MEROZ, Alice D. LAM, Daniel R. PASSMORE, Nir BEN-TAL, Stephen A. ERNST, Uri ASHERY a Edward L. STUENKEL, 2011. Structural and functional analysis of tomosyn identifies domains important in exocytotic regulation. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 286 (16), 14542–14553.
- WU, Hao, Guendalina ROSSI a Patrick BRENNWALD, 2008. The ghost in the machine: small GTPases as spatial regulators of exocytosis. *Trends in Cell Biology* [online]. 18(9), 397–404.

- YAMAMOTO, Yasunori, Kohei FUJIKURA, Mio SAKAUE, Kenjiro OKIMURA, Yuta KOBAYASHI, Toshihiro NAKAMURA a Toshiaki SAKISAKA, 2010a. The tail domain of tomosyn controls membrane fusion through tomosyn displacement by VAMP2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. B.m.: Elsevier Inc., 399(1), 24–30.
- YAMAMOTO, Yasunori, Sumiko MOCHIDA, Takao KUROOKA a Toshiaki SAKISAKA, 2009. Reciprocal intramolecular interactions of tomosyn control its inhibitory activity on SNARE complex formation. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 284 (18), 12480–12490.
- YAMAMOTO, Yasunori, Sumiko MOCHIDA, Naoyuki MIYAZAKI, Katsuhisa KAWAI, Kohei FUJIKURA, Takao KUROOKA, Kenji IWASAKI a Toshiaki SAKISAKA, 2010b. Tomosyn inhibits synaptotagmin-1-mediated step of Ca²⁺-dependent neurotransmitter release through its N-terminal WD40 repeats. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 285(52), 40943–40955.
- YIZHAR, Ofer a Uri ASHERY, 2008. Modulating vesicle priming reveals that vesicle immobilization is necessary but not sufficient for fusion-competence. *PLoS ONE* [online]. 3(7), 1–11.
- YIZHAR, Ofer, Noa LIPSTEIN, Svetlana E. GLADYCHEVA, Ulf MATTI, Stephen A. ERNST, Jens RETTIG, Edward L. STUENKEL a Uri ASHERY, 2007. Multiple functional domains are involved in tomosyn regulation of exocytosis. *Journal of Neurochemistry* [online]. 103(2), 604–616.
- YIZHAR, Ofer, Ulf MATTI, Rely MELAMED, Yamit HAGALILI, Dieter BRUNS, Jens RETTIG a Uri ASHERY, nedatováno. Tomosyn inhibits priming of large dense-core vesicles in a calcium-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 101 (8), 2578–2583.
- YOKOYAMA, Shigekazu, Hiromichi SHIRATAKI, Toshiaki SAKISAKA a Yoshimi TAKAI, 1999. Three splicing variants of tomosyn and identification of their syntaxin-binding region. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 256(1), 218–222.
- YU, Haijia, Shailendra S. RATHORE, Daniel R. GULBRANSON a Jingshi SHEN, 2014. The N- and C-terminal domains of tomosyn play distinct roles in soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor binding and fusion regulation. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 289(37), 25571–25580.
- ZANOLARI, B., U. ROCKENBAUCH, M. TRAUTWEIN, L. CLAY, Y. BARRAL a A. SPANG, 2011. Transport to the plasma membrane is regulated differently early and late in the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science* [online]. 124, 1055–1066.
- ZHANG, Wei a 2 and Björn Meister LENA LILJA, SLAVENA A. MANDIC, JESPER GROMADA, KAMILLE SMIDT, JULIETTE JANSON, YOSHIMI TAKAI, CHRISTINA BARK, PER-OLOF BERGGREN, 2006. Tomosyn Is Expressed in β -Cells and Negatively Regulates Insulin Exocytosis. *Diabetes* [online]. 55, 574–581.
- ZHANG, Xiaoyu, Puyue WANG, Akanksha GANGAR, Jian ZHANG, Patrick BRENNWALD, Daniel TERBUSH a Wei GUO, 2005. Lethal giant larvae proteins interact with the exocyst complex and are involved in polarized exocytosis. *Journal of Cell Biology* [online]. 170 (2), 273–283.